

# **Selektion von Lassa Fieber Virus spezifischen single chain Fv Antikörperfragmenten aus einer Immun- Antikörperbibliothek mittels Phage Display**



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT



Vom Fachbereich Chemie  
**der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor rerum naturalis (Dr. rer. nat)

genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

**Diplom-Biologin Nataliya Karpenko**

aus

Stawyschtsche, Gebiet Kiew

Referent:	Prof. Dr. H. Kolmar
Koreferent:	Prof. Dr. N. A. Dencher
Tag der Einreichung:	12. September 2011
Tag der mündlichen Prüfung:	24. Oktober 2011

Darmstadt 2012

**D17**

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Dr. U. Dietrich am Georg-Speyer Haus, Chemotherapeutisches Forschungsinstitut, Paul-Ehrlich-Str. 42-44, 60596 Frankfurt am Main angefertigt.

Die Betreuung seitens des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar vom Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt.

## ***Danksagung***

Mein Dank gilt all jenen, die durch Ihre Anregungen und Unterstützung zum Erfolg meiner Dissertation beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar von der Technischen Universität Darmstadt danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und für den entscheidenden Tipp zu meiner Arbeit, sowie für seine schnelle und unkomplizierte Bereitschaft zur Übernahme der Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Norbert A. Dencher gilt mein Dank für die seine jahrelange Unterstützung und die Begutachtung dieser Arbeit.

Frau Dr. Ursula Dietrich vom Georg-Speyer Haus ermöglichte mir die praktische Durchführung der Arbeit in ihrem Labor. Durch ihr großes Engagement für mein Projekt und ihr Vertrauen in mich hat sie maßgeblich dazu beigetragen, dass diese Arbeit gelang. Für ihre fortwährende berufliche Förderung und Unterstützung bin ich ihr sehr dankbar.

Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und praktische Unterstützung, vor allem für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren. Auch Herrn Dr. Stefan Günther vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin sowie Herrn Dr. Manuel Grez vom Georg-Speyer Haus gilt mein Dank für das zur Verfügung gestellte genetische Material.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Michael Hust, Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel und Frau Saskia Helmsing von der Technischen Universität Braunschweig für die Bereitschaft ihr Wissen und ihr praktisches Können geduldig zu vermitteln.

Den Mitarbeitern des Klinikums der Goethe Universität in Frankfurt am Main Dr. Stefan Schilling und Prof. Dr. Hans-Reinhard Brodt danke ich für die Kooperation und die Bereitstellung der Patientenproben.

Herrn Prof. Dr. Stefan Kunz vom CHUV in Lausanne bin ich zu tiefstem Dank für seine Offenheit, unglaubliche Gastfreundschaft und wissenschaftliche Kompetenz verpflichtet.

Meinen Kollegen (jetzigen und ehemaligen) gilt ebenfalls mein Dank. Ihr seid der Grund, warum ich in Phasen der tiefsten Verzweiflung nicht aufgab. Es war mir eine Freude mit euch zu arbeiten.

Allen Mitarbeitern des Georg-Speyer Hauses danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meiner guten Freundin und exzellenten Wissenschaftlerin Dr. Monika Frenzel danke ich für unsere jahrelange Freundschaft und die Korrekturen meiner Arbeit.

Meiner neuen Kollegin Frau Dr. Cornelia Luban bin ich für die wertvollen Ratschläge zur Fertigung dieser Arbeit sehr dankbar.

Meinem Mann Björn Kudelka möchte ich für seine Geduld, sein Vertrauen und die Korrekturen an dieser Arbeit danken.

Meinen Eltern, welche immer für mich da sind, gilt mein besonderer Dank für ihre Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Meinem Schwager Frank Herberg danke ich für die tiefe Herzlichkeit, Weisheit und Zuversicht, welche mich seit Jahren in Deutschland begleiten.

Und nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner lieben Schwester Lena Herberg für den Glauben an mich, für die Hoffnung und Aufmunterung sowie für bedingungsloses Dasein bedanken.



## ***Zusammenfassung***

Durch die zunehmende Globalisierung, eine stark erhöhte individuelle Mobilität sowie durch eine Veränderung der Umwelt und des Lebensstils der Menschen in den letzten Jahrzehnten muss eine ganze Reihe von Infektionen als klinisch neue Erkrankungen definiert werden. Zu solchen Erregern gehört auch das in West Afrika endemische Lassa Fieber Virus (LASV), ein Vertreter der Gruppe der Negativ-Strang RNA Viren, welches ein schweres hämorrhagisches Fieber auslöst. Gegenwärtig existieren weder eine Prophylaxe, eine spezifische Therapie noch ein Impfstoff gegen das LASV. Zudem erfordern die Diagnostik sowie Erforschung von Lassa Viren besondere Schutzmaßnahmen und Vorkehrungen, da aufgrund der hohen Übertragungsrate von Mensch zu Mensch und der hohen Sterblichkeitsrate das Lassa Fieber Virus in die höchste biologische Sicherheitsstufe BSL-4 eingeordnet ist.

Obwohl die protektive Wirkung Virus-neutralisierender Antikörper in unabhängigen Studien sowohl am Tiermodell und als auch mit infizierten Menschen mehrfach demonstriert wurde, stehen aktuell nur wenige nicht käufliche Antikörper gegen Lassa-virale Proteine zur Verfügung und über deren Entstehung, Eigenschaften sowie Kinetik bei der Kontrolle der Virämie ist kaum etwas bekannt. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die humorale Antwort eines LASV-infizierten Patienten, welcher die Erkrankung überlebte, eingehend analysiert werden.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war ein im Juli 2006 an hämorrhagischem Lassa Fieber erkrankter Patient aus Sierra Leone. Der Patient wurde erfolgreich mit Ribavirin therapiert. Während der nachfolgenden Untersuchungen im Zeitraum vom 2006 bis 2010 wurden insgesamt fünf Blutproben entnommen, welche hinsichtlich der Bindungs- sowie Neutralisationseigenschaften der Antikörper in verschiedenen Assays untersucht wurden. Es konnten in vier der fünf Serumproben sowohl bindende als auch neutralisierende Antikörper ermittelt werden.

Ziel dieser Arbeit war es eine scFv-Immunbibliothek aus den B-Lymphozyten des Patienten, aus welcher über Biopanning Virus-spezifische scFv-Fragmente isoliert wurden, zu erstellen. Parallel wurde eine weitere naive Bibliothek HAL4/7 für die Selektion positiver scFs seitens der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dübel (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Als Grundlage für eine Selektion dienten zum einen die mithilfe der Pseudotypisierung hergestellten, retroviralen heterologen LASV Partikel und zum anderen lösliche, mittels humaner Zellen exprimierte, virale Glykoproteine 1, welche in Kooperation mit Prof. Dr. S. Kunz am Institut de Microbiologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (Lausanne, Schweiz) erzeugt wurden. Da pseudovirale Partikel das native Target darstellen, galt diesem Ansatz ein besonderes Interesse. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Selektion der spezifischen scFv war die Immobilisierung der viralen Partikel an geeignete Trägermoleküle. Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene Methoden entwickelt und getestet. Am erfolgreichsten erwies sich dabei die Biotinylierung der Partikel mit anschließender Immobilisierung über Streptavidin. Nach der Etablierung der Immobilisierungsmethode für virale Partikel erfolgte das Screening der Immunbibliothek, wobei eine Anreicherung LASV spezifischer

scFv stattfand. Durch die Selektion konnten vier positive Klone isoliert werden. Die Sequenzanalyse dieser Klone zeigte, dass es sich dabei um drei verschiedene Fragmente handelt, da zwei der vier scFv (D1 und D8) die gleiche Sequenz aufweisen. Interessant ist, dass das zweifach vorkommende Fragment eine verkürzte schwere Kette hat. Die identifizierten scFv wurden in *E. coli* exprimiert und die scFv-haltigen bakteriellen Überstände wurden nach der Aufreinigung auf Neutralisation von LASV getestet. Bei dem Neutralisationsassay zeigten zwei der drei Klone eine deutliche Verringerung der Infektion um ca. 40%.

Bei der Selektion der naiven Bibliothek HAL4/7 konnten weitere Klone isoliert werden, deren Bindungskapazitäten jedoch relativ gering waren. Dennoch wurden die identifizierten scFv-Fragmente in Neutralisationstests eingesetzt, wobei sich zeigte, dass zwei von neun Klonen als eindeutig neutralisierend deklariert werden konnten. Eine anschließende Sequenzanalyse ergab jedoch nur eine Konsensussequenz, welche als C8/B5 Klon bezeichnet wurde. In Gegenüberstellung mit den Sequenzen der Klone aus der Immunbibliothek konnten keine Übereinstimmungen bzw. Homologien festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein experimentell nicht angewandtes System etabliert werden, welches durch Verwendung geeigneter LASV Hüllproteintargets, sowie der Antikörper-Phagenbanken erlaubt, LASV-spezifische Antikörper zu selektieren. Somit können diese in Hinsicht auf ihren Ansatz für diagnostische und therapeutische Anwendungen analysiert werden.

## ***Summary***

The entrance of new or rare viruses into the human population requires the development or adaptation of diagnostic tests for these pathogens as well as an identification of new antigenic determinants. Furthermore, new therapeutic approaches are needed in case only a few drugs are available or resistant viruses have appeared. Virus entry inhibition represents an attractive target for therapeutic purposes, as inhibition at this early step would prevent the *de novo* infection of cells.

The aim of this PhD thesis is to generate human monoclonal antibodies against Lassa Fever Virus for diagnostic or therapeutic purposes using the phage-display technique. Currently, there are neither licensed vaccines against Lassa Fever, nor experimental vaccines that have completely protected nonhuman primates against a lethal challenge. Such antibodies will be helpful for diagnostics and in case of neutralization for vaccination purposes.

Lassa Fever Virus (LFV) is the causative agent of Lassa viral hemorrhagic fever and belongs to CDC Category A agents. The virus is a single stranded RNA virus belonging to the Arenaviridae. The surface of the virion is studded with glycoprotein (GP) complexes which are responsible for the LFV infection and thus are the principal target for virus neutralizing antibodies.

This work was based on a patient from Sierra Leone infected with LASV. The patient was hospitalized at the University Clinics and treated with ribavirin. He survived the infection. This allowed us to obtain blood samples from the patient and to analyze the presence of LFV-specific antibodies in his plasma. Their presence would qualify the patient as suited for the derivation of antibody fragments from his B cells.

The presence of LFV binding and neutralizing antibodies in the patient sera was analyzed. The titer of LFV binding antibodies was determined. The neutralizing activity was detected in the serum of the patient using pseudotyped Lassa Fever Viruses. Neutralizing antibody titers increased over time in the samples.

The heavy and light chains from IgG genes were amplified by PCR from cDNA from patient's lymphocytes and cloned into the phage vector pHAL 14 (in cooperation with the group of Prof. Stefan Dübel in Braunschweig). A single chain Fv library was generated to select LFV GP specific antibody fragments. The library was used for the selection of LFV specific scFv fragments using pseudotyped LFV in positive and Moloney Murine Leukemia virus (MLV) negative selections. Optimized conditions for the target immobilization were established for the screenings. The pseudotyped viruses were coated on magnetic beads or ELISA-plates via Biotin/Streptavidin binding. Furthermore in cooperation with the group of Prof. Dr. S. Kunz (Institut de Microbiologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Schweiz), a soluble LFV-Glycoprotein 1 was successfully expressed in mammalian cells, which was also used as a target for screenings. Additionally, the naive library pHAL4/7 was selected for binding and neutralizing antibodies.

Three positive clones from the immune and one clone from the naïve library could be isolated. The corresponding scFv were expressed in *E. coli* for further characterization. Culture supernatants containing the scFv neutralized LFV entry by 40%.

Thus, binding and neutralizing antibody fragments against LASV could be selected that have now to be further characterized in view of their potential application for diagnostic and therapeutic purposes.

## **Veröffentlichungen**

### Posterpräsentationen

#### **19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Virology GfV, March 2009, Leipzig, Germany**

*Nataliya Karpenko, Michael Hust, Stefan Schilling, Hans-Reinhard Brodt, Dorothe von Laer, Stefan Dübel, Ursula Dietrich*

Generation of a Lassa Fever Virus specific single chain Fv library from a Lassa viral hemorrhagic fever patient

#### **Medical Biodefence Conference, Oktober 2009, Munich, Germany**

*Nataliya Karpenko, Michael Hust, Bianca Gilbert, Ana Gongalves, Stefan Schilling, Hans-Reinhard Brodt, Harald Kolmar, Dorothe von Laer, Stefan Kunz, Stefan Dübel, Ursula Dietrich*

Generation of a Lassa Fever Virus specific single chain Fv library from a Lassa viral hemorrhagic fever patient and preparation of target for biopanning

#### **4<sup>th</sup> European Virology Conference, April 2010, Como, Italy**

*Nataliya Karpenko, Michael Hust, Ana Gongalves, Stefan Schilling, Hans-Reinhard Brodt, Harald Kolmar, Dorothe von Laer, Stefan Kunz, Stefan Dübel, Ursula Dietrich*

Generation of a Lassa Fever Virus specific single chain Fv library from a Lassa viral hemorrhagic fever patient and preparation of target for biopanning

#### **14<sup>th</sup> Negative Strand Virus Meeting, June 2010, Bruges, Belgium**

*Nataliya Karpenko, Michael Hust, Ana Gongalves, Stefan Schilling, Hans-Reinhard Brodt, Harald Kolmar, Dorothe von Laer, Stefan Kunz, Stefan Dübel, Ursula Dietrich*

Selection of Lassa Fever Virus specific single chain Fv antibody fragments by phage display

### Manuskript in Vorbereitung

*N. Karpenko, M. Hust, M. Hertje, P. Schult-Dietrich, A. Gongalves, S. Schilling, H.-R. Brodt, H. Kolmar, D. von Laer, S. Kunz, S. Dübel, U. Dietrich (2011) „Selection of Lassa Fever Virus specific single chain Fv antibody fragments by phage display”*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Das Lassa Virus .....</b>	<b>4</b>
1.1.1. Taxonomie des Lassa Virus .....	4
1.1.2. Virusstruktur .....	6
1.1.2.1. Allgemeiner Virusaufbau .....	6
1.1.2.2. Virale Proteine .....	7
1.1.3. Viruseintritt in die Zelle .....	11
1.1.3.1. Zellulärer Rezeptor .....	11
1.1.3.2. Rezeptorbindung und Fusion .....	12
1.1.4. Replikationszyklus .....	12
1.1.5. Antivirale Therapie .....	13
1.1.6. Epidemiologie, Pathogenese und Klinik des Lassa Fiebers .....	14
1.1.7. Immunantwort gegen das Lassa Fieber Virus .....	15
1.1.7.1. Zelluläre Antwort .....	15
1.1.7.2. Humorale Antwort .....	16
1.1.8. Neue therapeutische Ansätze gegen das Lassa Fieber Virus .....	18
<b>1.2. Antikörper.....</b>	<b>19</b>
1.2.1. Antikörperstruktur und Expression von Antikörpergenen .....	19
1.2.2. Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente .....	21
<b>1.3. Antikörper Phage-Display Technologie .....</b>	<b>22</b>
1.3.1. Aufbau von M13 Phagen .....	23
1.3.2. Antikörperbibliotheken .....	24
<b>1.4. Selektion spezifischer Antikörperphagen (Biopanning) .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5. Produktion von Zielproteinen für Biopanning: lösliche Proteine und virale Partikel.....</b>	<b>26</b>
<b>1.6. Projektbeschreibung und Zielsetzung .....</b>	<b>29</b>
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Verbrauchsmaterialien und Lösungen .....</b>	<b>31</b>
2.1.1. Lösungen und Medien .....	32
2.1.2. Nährmedien und Zusatzstoffe für die Zellkultivierung .....	33
2.1.3. Vektoren und Plasmide .....	33
2.1.4. Primer .....	34
2.1.5. Enzyme .....	36
2.1.6. Kit-Systeme .....	37
2.1.7. Antikörperbibliotheken .....	37
2.1.8. Antikörper und Seren .....	37
2.1.9. Bakterien und Bakteriophagen .....	38
2.1.10. Zelllinien .....	38
2.1.11. Einwegmaterial .....	39
2.1.12. Geräte .....	40
2.1.13. Wissenschaftliche Programme und Datenbanken .....	41
<b>2.2. Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>42</b>
2.2.1. Kultivierung und Lagerung von E. coli .....	42
2.2.2. Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	42
2.2.3. Transformation von E. coli .....	42
2.2.4. Selektion von scFv-präsentierenden Phagen aus Antikörperbibliotheken .....	43
2.2.5. Infektion von Bakterien mit eluierten Phagen .....	44
2.2.6. Phagenproduktion: Verpacken mit Helferphagen .....	44
2.2.7. Titerbestimmung der Phagen .....	45
2.2.8. Produktion von löslichen scFv-Fragmenten .....	45
2.2.9. Aufreinigung von scFv-Überständen mittels Detoxi Gel Endotoxin Removing Säulen .....	46
<b>2.3. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>47</b>
2.3.1. Plasmidpräparation und photometrische DNA-Quantifizierung .....	47

2.3.2.	Enzymatische Restriktionsanalyse von DNA .....	47
2.3.3.	Isolierung der RNA aus Patienten Lymphozyten und Synthese der cDNA .....	48
2.3.4.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	48
2.3.5.	DNA-Gelelektrophorese .....	50
2.3.6.	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	50
2.3.7.	Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase .....	51
2.3.8.	Ligation von DNA-Fragmenten .....	51
2.3.9.	DNA-Sequenzierung und Analyse .....	51
<b>2.4.</b>	<b>Methoden der Zellkultur .....</b>	<b>52</b>
2.4.1.	Allgemeine Kulturbedingungen .....	52
2.4.2.	Passagieren von Zellen (Suspension- und adhärenzte Zelle) .....	52
2.4.3.	Kryokonservierung von Zellen .....	52
2.4.4.	Isolierung von PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) aus Blut .....	52
2.4.5.	Transiente Transfektion zur Herstellung von Viren und zur Proteinexpression .....	53
2.4.6.	Herstellung der CD20/CD34 positiven Zellen und deren Anreicherung durch magnetische Zellseparation (MACS) .....	55
2.4.7.	Aufkonzentrierung von Viruspartikeln .....	56
2.4.8.	Transduktion von Zellen zur Titerbestimmung der viralen Partikel .....	56
2.4.9.	Färbung von Zellen und Beads, Durchflusszytometrie .....	57
2.4.10.	Neutralisationsassay .....	58
2.4.11.	Zytotoxizitätsassay .....	59
<b>2.5.</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>59</b>
2.5.1.	Immobilisieren von Viren direkt an Beads und auf ELISA-Platten .....	59
2.5.2.	Immobilisieren von Viren indirekt via Biotin-Streptavidin-Bindung .....	60
2.5.3.	Produktion und Immobilisierung von löslichen Proteinen .....	61
2.5.4.	ELISA Test .....	61
2.5.5.	Western Blot .....	62
2.5.6.	Methodenübersicht .....	62
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
<b>3.1.</b>	<b>Klinische Daten des Lassa Fieber Patienten .....</b>	<b>64</b>
<b>3.2.</b>	<b>Analyse der Lassa GCP-spezifischen Antikörper in den Patientenseren .....</b>	<b>64</b>
<b>3.3.</b>	<b>Erstellung einer Antikörperbibliothek .....</b>	<b>67</b>
3.3.1.	Gesamt-RNA Isolierung zur Erstellung einer scFv-Antikörperbank des Lassa Fieber Patienten .....	67
3.3.2.	Amplifikation der Antikörpergene für die Herstellung der scFv-Immunbibliothek .....	68
3.3.3.	Klonierung der Antikörpergene in pHAL14 Vektor .....	69
3.3.4.	Qualitätskontrolle der Bibliothek .....	72
<b>3.4.</b>	<b>Herstellung der Zielstrukturen für Biopanning .....</b>	<b>73</b>
3.4.1.	Herstellung viraler pseudotypisierter Partikel .....	74
3.4.2.	Sequenzalignment der Glykoproteinprecursor der LASV Stämme Josiah, AV, CSF, NL .....	75
3.4.3.	Klonieren von Lassa NL-, AV-, CSF -GP sowie Z-Protein in M288 Expressionsvektor .....	78
3.4.4.	Einfluss des Lassa Z-Proteins auf den Titer der viralen Partikel .....	79
3.4.5.	Produktion von löslichen Delta33-GP1-Proteinen .....	81
<b>3.5.</b>	<b>Strategien zur Selektion der Antikörperfragmente .....</b>	<b>82</b>
3.5.1.	Immobilisierung LASV-GPC-pseudotypisierter Viren auf magnetischen Beads .....	83
3.5.2.	Immobilisierung von pseudotypisierten Viren auf Mikrotiterplatten .....	85
3.5.3.	Alternative Produktion von viralen Partikeln in HeLa sowie CD20/CD34 positiven 293T Zellen .....	87
3.5.4.	Immobilisierung der in 293T CD20/CD34 positiven Zellen hergestellten pseudotypisierten Viren .....	88
3.5.5.	Immobilisierung von viralen Partikeln mithilfe der Streptavidin-Biotin-Bindung .....	90
3.5.6.	Überprüfung der Infektiosität von biotinylierten Partikeln .....	93
3.5.7.	Bindung der löslichen Glykoproteine 1 .....	95
<b>3.6.</b>	<b>Selektion und Charakterisierung von LASV-GPC-spezifischen scFv-Antikörperfragmenten. ....</b>	<b>96</b>
3.6.1.	Selektion von LASV-GPC-spezifischen scFv-Antikörperfragmenten aus der Immunbibliothek .....	96
3.6.2.	Analyse der Bindungsspezifität der selektierten scFv-Antikörperfragmente im ELISA-Test .....	97
3.6.3.	Selektion und Analyse von LASV spezifischen scFv-Antikörperfragmenten aus der naiven Bibliothek .....	100
HAL4/7	.....	100

---

3.6.4.	Einzel ELISA-Test mit selektierten Klonen .....	101
<b>3.7.</b>	<b>Analyse der isolierten spezifischen scFv-Fragmente.....</b>	<b>102</b>
3.7.1.	Untersuchung der isolierten scFv-Fragmente in analytischem Gel.....	103
3.7.2.	Analyse der Neutralisationskapazität der selektierten scFv .....	103
3.7.3.	Untersuchung von Zytotoxizitätseigenschaften aus Bibliotheken selektierter Klone.....	106
3.7.4.	Western-Blot Analyse der selektierten scFv-Fragmente.....	106
3.7.5.	Sequenzanalysen der isolierten scFv-Fragmente .....	107
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>112</b>
4.1.	Klinische Daten des Lassa Fieber Patienten .....	112
4.2.	Herstellung von Phagen-Bibliotheken .....	114
4.3.	Produktion und Immobilisierung von Zielproteinen für das Biopanning .....	115
4.3.1.	Expression löslicher Glykoproteine 1 .....	116
4.3.2.	Herstellung von pseudotypisierten viralen Partikeln .....	117
4.3.3.	Immobilisierung von pseudotypisierten viralen Partikeln .....	119
4.4.	Biopanning der Antikörperbibliotheken und Charakterisierung spezifischer Phagen.....	122
4.4.1.	Selektion und Analyse der Phagen aus der Immunbibliothek.....	122
4.4.2.	Selektion und Analyse der Phagen aus der naiven Bibliothek HAL4/7.....	124
<b>5.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>125</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>126</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>137</b>
7.1.	Vektorkarten.....	137
7.2.	Abkürzungen .....	145
7.3.	Abbildungsverzeichnis .....	147
7.4.	Tabellenverzeichnis .....	150
7.5.	Sequenzen der isolierten scFv-Fragmente.....	151



---

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Lassa Virus

Das Lassa Fieber Virus (LASV), ein Vertreter der Gattung Arenavirus, wird bereits seit den 50er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts bekannt. Allerdings gelang es, erst 1969 den Erreger zu isolieren (Buckley and Casals 1970). Das Virus ist in Teilen Sierra Leones, Nigerias und Liberias endemisch und verursacht das so genannte Lassa Hämorrhagische Fieber (Lassa Fieber), eine oft tödlich verlaufende Erkrankung.

Nach Angaben des CDC (Center for Disease Control and Prevention) beläuft sich die Zahl der in Westafrika auftretenden Lassa-Virusinfektionen auf 100.000 bis 300.000 pro Jahr, davon 5000 Todesfälle. Aufgrund einer hohen Übertragungsrate von Mensch zu Mensch und hohen Mortalität (Sterblichkeitsrate), unterliegt das Lassa Fieber Virus der höchsten biologischen Sicherheitsstufe BSL-4 (Biosafety Level 4) und ist vom NIAID (National Institut of Allergy and Infectious Diseases) als Biowaffe der Kategorie A eingestuft (Borio, Inglesby et al. 2002).

Besondere Bedeutung gewann die Arenaviren-Forschung durch die immer wieder auftretenden Fälle der viralen Infektion infolge einer Transplantation. So starben im Dezember 2003 und im April 2005 in Rhode Island (Amerika) sieben von acht Rezipienten (zwei Patientencluster) nach einer erfolgreichen Organtransplantation an Folgen einer Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) Infektion (Fischer, Graham et al. 2006). Ein anderer Vorfall ereignete sich in Australien, wobei alle drei Organrezipienten einer Infektion mit einem neuartigen Arenavirus erlagen. Die Sequenzanalysen des neuen Virus offenbarten dessen hohen Verwandtschaftsgrad mit LCMV (Palacios, Druce et al. 2008). Zurzeit sind keine Routine-PCR-Tests zum Arenavirusnachweis in den Organproben vorhanden (Dr. S. Kunz, persönliche Mitteilung). Umso wichtiger ist die Entwicklung neuartiger breit wirkender Therapien, vor allem neutralisierender Antikörper, gegen solche Infektionen.

### 1.1.1. Taxonomie des Lassa Virus

Das Lassa Fieber Virus gehört zur Familie der *Arenaviridae*, welche nur eine Gattung Arenavirus beinhaltet. Die Arenaviren sind als umhüllte, segmentierte negativsträngige RNA-Viren klassifiziert. Phylogenetisch ist die Familie *Arenaviridae* mit weiteren Vertretern der segmentierten negativsträngigen RNA-Viren wie *Bunyaviridae* und *Orthomyxoviridae* verwandt. Alle drei Familien zeichnen sich durch Ähnlichkeiten im Replikationszyklus aus (Vieth, Torda et al. 2004). Die Familie *Arenaviridae* besteht aus 23 verschiedenen Spezies, welche anhand der serologischen, phylogenetischen sowie geografischen Merkmale in zwei große Gruppen unterteilt sind: *Altwelt-* (umfasst Vertreter aus Afrika, Europa und Asien) und *Neuwelt Arenaviren* (Viren endemisch in Nord und Süd Amerika) (Emonet, Lemasson et al. 2006).

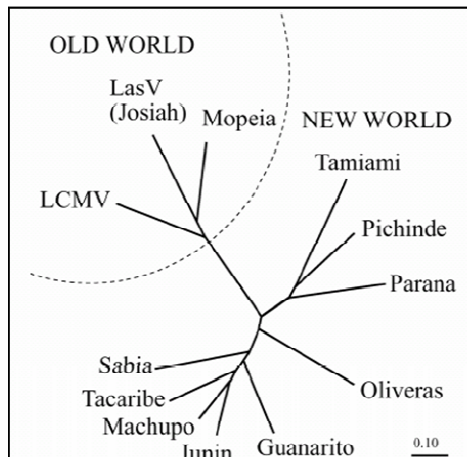


Abbildung 1: **Die Vertreter der Arenaviridae** sind gemäß ihrer geographischen Verbreitung in die *Altwelt-* und *Neuwelt-Arenaviren* unterteilt. LCMV ist als einziges Arenavirus weltweit verbreitet (<http://www.virology.ws/>)

Zu der Altwelt Gruppe zählen Lassa Virus, Mopeia Virus, Mobala Virus und Ippy Virus. Die Neuwelt Gruppe ist größer und lässt sich anhand der Sequenzanalyse der RNA-abhängigen RNA-Polymerase der Arenaviren in drei Linie (A, B, C) unterteilen (Bowen, Rollin et al. 2000). Alle zur Linie B zugehörigen Viren sind humanpathogen und lösen hämorrhagische Fiebererkrankungen aus. Dazu zählen das Junin-Virus (Argentinisches-Hämorrhagisches-Fieber), das Machupo-Virus (Bolivianisches-Hämorrhagisches Fieber), das Guanarito-Virus (Venezolanisches Hämorrhagisches Fieber) und das Sabia-Virus (Brasilianisches Hämorrhagisches Fieber). Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) ist als einziges Arenavirus in beiden Welten vertreten und stellt das Bindeglied zwischen Alt- und Neuwelt Arenaviren dar (Charrel, Brault et al. 2003; Charrel, Lemasson et al. 2003).

Die Arenaviren sind zoonotisch, wobei die in den entsprechenden Regionen endemischen Nagetiere als natürliches Reservoir dienen. Die Wirtinfektion verläuft asymptomatisch. Die Vielzitzenmaus *Mastomys natalensis* wurde als Wirtspezie für das Lassa Fieber Virus identifiziert (Salazar-Bravo, Ruedas et al. 2002; Lecompte, Fichet-Calvet et al. 2006). Sieben weitere Lassa Viren sind bekannt (Tab. 1).

Tabelle 1: **Auflistung der bekannten Lassa Fieber Virusstämme**

Spezies	GenBank accession number
LASV Josiah	NC_004296
LASF Josiah	AY628203
NL	AY179173
z148	AY628205
Macenta	AY628201
AV	AF246121
CSF	AF333969

Die hohe Homologie innerhalb dieser Stämme wurde durch die komplette Sequenzanalyse der GPC, NL, L und Z Gene nachgewiesen (Emonet, Lemasson et al. 2006).

## 1.1.2. Virusstruktur

### 1.1.2.1. Allgemeiner Virusaufbau

Lassa Fieber Virionen sind lipidumhüllte, pleiomorphe Partikel, mit einem Durchmesser von 40 bis 200 nm. Im Elektronenmikroskop weisen sie körnige Strukturen auf. Dabei handelt es sich um Ribosomen, welche aus den Wirtszellen stammen und bei der Virusvermehrung in neu gebildete Virione eingebaut werden (Buchmeier, Elder et al. 1978). Von diesem granulären Aussehen der viralen Partikel leitet sich der Name der Familie Arenaviridae („*arenosus*“ sandig) ab. Das Genom eines Virions ist in ein Ribonukleokapsid verpackt und besteht aus zwei Segmenten L und S (Large und Small). Die in der Lipidhülle eingebetteten Glykoproteine (GP) ragen 8-10 nm über die Membran hinaus und bestehen aus einer GP2 Untereinheit (Abb.: 2), welche in der Lipidmembran der Virusoberfläche verankert ist, und aus einer peripheren GP1 Untereinheit, welche als Rezeptorbindepartner fungiert (Buchmeier and Oldstone 1979; Kunz, Edelmann et al. 2003). Die einzelnen Glykoproteine bilden Trimere, die sogenannten „Spikes“ (Neuman, Adair et al. 2005; Eschli, Quirin et al. 2006). Die Anzahl der „Spikes“ auf der Virusoberfläche ist noch nicht genau ermittelt und wird auf 50 bis 1400 geschätzt (Neuman, Adair et al. 2005).

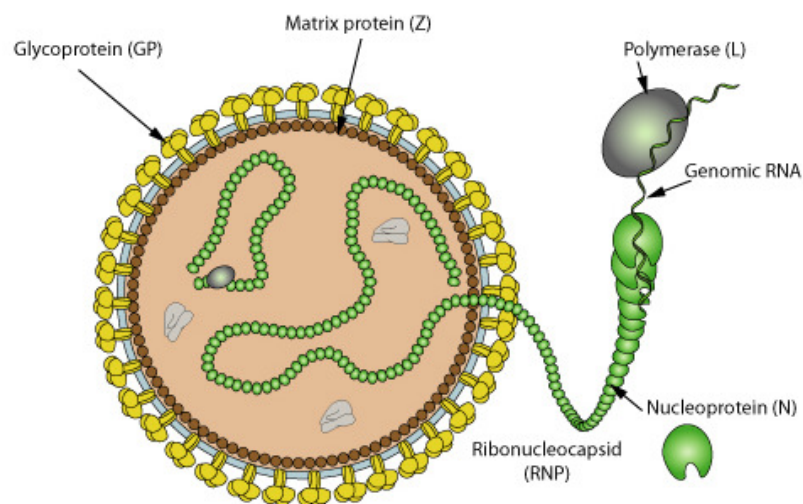


Abbildung 2: **Schematische Darstellung eines Lassa Virions** (Viral Hemorrhagic Fever Consortium: <http://vhfc.org>).

Wie bereits erwähnt, sind für Arenaviridae die zwei einzelsträngigen RNA-Segmente mit einer Ambisense-Polarität charakteristisch. Der Term *Ambisense* bezieht sich auf die Tatsache, dass beide L und S Segmente eine Region in pseudopositiver Orientierung sowie eine Region in negativer Orientierung aufweisen. Die Einschränkung *Pseudo* weist darauf hin, dass keine Evidenzen vorliegen, welche zeigen, dass diese Regionen direkt als mRNAs dienen. Das L RNA-Segment ist ca. 7,5 kb groß und kodiert die virale Polymerase (am 3'-Ende negativer Orientierung) sowie das Matrix Protein Z (am 5'-Ende in positiver Orientierung) (Abb.: 3).

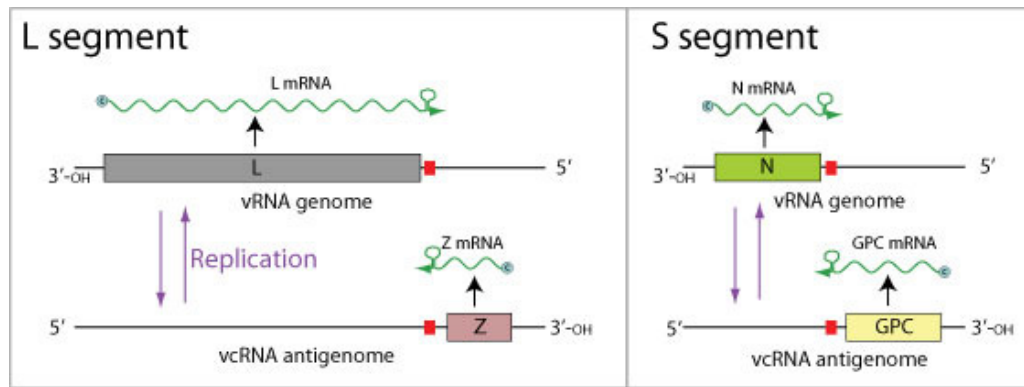


Abbildung 3: **Genomorganisation und Replikation der Arenaviridae.** Das Genom besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Segmenten in Negativstrangorientierung (Ambisense-Polarität); die genomischen wie auch die antigenomischen RNAs werden als Matrize für die mRNA-Synthese verwendet; das L-Segment beinhaltet die Gene für die RNA-Polymerase (L) und das Matrix-Protein (Z); die Gene des S-Segmentes codieren für das Nukleoprotein (NP) und den Glykoproteinvorläufer (GPC) (ViralZone2008-Arenavirus, Swiss Institute of Bioinformatics).

Das kleinere Segment weist eine Größe von 3,5 kb auf und enthält Informationen für das virale Nukleoprotein (NP) (am 3'-Ende negativer Orientierung) und den Glykoproteinvorläufer (GPC) (am 5'-Ende in positiver Orientierung) (Salvato, Schweighofer et al. 1992). Die kodierenden Bereiche werden durch nicht kodierende intergenische Regionen (IGR) separiert.

### 1.1.2.2. Virale Proteine

#### Nukleoprotein

Das Nukleoprotein N ist das häufigste Protein in einem Lassa Fieber Virus (1500 Moleküle/Virion) und ist der Hauptbestandteil des Nukleokapsids. Das Protein besteht aus etwa 570 AS (MM 60 kDa) und ist mit der genomischen RNA assoziiert. Während der akuten Infektion bildet das Nukleoprotein zusammen mit der RNA den infektiösen Ribonukleoprotein-Komplex und übt eine wichtige Funktion bei der Transkription und Translation aus (Lee, Novella et al. 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in der späteren Phase der Erkrankung eine phosphorylierte Form des Nukleoproteins vorliegt und die Häufigkeit dieser Form in Zellen mit einer persistierenden Infektion zunimmt (Bruns, Zeller et al. 1986). Des Weiteren wurde eine räumliche Nähe des Nukleoproteins zum membranverankerten GP2 (Neuman, Adair et al. 2005) demonstriert, was auf eine Interaktion zwischen beiden Proteinen hindeutet. Diese Wechselwirkung spielt eine wichtige Rolle beim Virusbudding.

#### Matrix Z Protein

Das *Small RING finger* Z Protein besteht aus 90-99 AS und ist 11 kDa schwer. Dank einer zentralen RING Domäne, welche ca. 60 AS lang ist und konservierte Cystein- und Histidinreste enthält, ist das Protein in der Lage, zwei Zink-Ionen zu binden (Perez, Craven et al. 2003). Zudem erfährt das Protein eine posttranslationale Modifikation-N-Myristoylierung (Capul, Perez et al. 2007), wobei die Myristinsäure (Myristat) an den N-terminalen Glycinrest von Proteinen angehängt wird (Perez, Greenwald et al. 2004; Strecker, Maisa et al. 2006).

Die Funktionen des Z Proteins sind vielfältig. Bei Arenaviren fungiert es als ein Matrixprotein, beteiligt sich an der Freisetzung neuer Virionen aus den infizierten Zellen und rekrutiert weitere virale Bestandteile in die Zellmembran (Eichler, Strecker et al. 2004).

Es wird vermutet, dass das Z Protein zudem als Genom-Replikations- bzw. Transkriptionsfaktor fungiert. Allerdings sind die dahinter stehenden Mechanismen nicht vollständig aufgeklärt. (Strecker, Eichler et al. 2003).

Des Weiteren interagiert das Protein mit NP (Eichler, Strecker et al. 2004). Diese Interaktion erfolgt durch die so genannten „Late-Domänen“, welche kurze prolinreiche Sequenzen aufweisen. Diese Domänen wurden bereits in den Gag-Proteinen der Retroviren sowie in den Matrixproteinen von Rhabdo- und Filoviren identifiziert (Freed 2003). Die „Late-Domäne“ wechselwirkt mit zellulären Proteinen wie Tsg101 und Nedd4 und steuert somit die Virusfreisetzung (Shtanko, Watanabe et al. 2011).

Außerdem kann das Z Protein der Lassa Fieber Viren mit der Lipidmembran in Abwesenheit von anderen viralen Proteinen interagieren. Dies führt dazu, dass große, sphärische „*virus like*“ Partikel (120-200 nm) gebildet werden, wobei zwei „Late Domänen“ PTAP und PPPY dabei eine wichtige Rolle spielen (Strecker, Eichler et al. 2003).

Eine weitere Funktion besteht in der Interaktion des Z-Proteins mit dem Promyelozytischen-Leukämie-Protein (PML). Vermutlich aufgrund dieser Wechselwirkung migriert PML aus dem Nukleus ins Zytoplasma (Borden 1998). PML ist in der Lage, zusammen mit den anderen zellulären Partnern die PML-Kernkörperchen zu bilden, welche in eine Vielzahl essenzieller zellulärer Prozesse, wie Apoptosis, Zellproliferation und Transkription, involviert sind. Des Weiteren ist PML ein interferonstimuliertes Protein und diese Wechselwirkung kann die antivirale Immunantwort beeinflussen. Somit kann durch diese Verlagerung des PML eine Abschwächung der Wirtszellantwort erzielt werden (Bonilla, Pinschewer et al. 2002). Zudem wird angenommen, dass gerade die Interaktion zwischen dem Z Protein und PML Apoptose hemmt (Borden, Campbell Dwyer et al. 1997; Borden, Campbell Dwyer et al. 1998).

Als ein weiterer zellulärer Interaktionspartner für das Z Protein wurde der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor 4E (eIF4E) identifiziert. Dabei reduziert das Z Protein die Affinität des Faktors für sein Substrat (Cap-Struktur von mRNA) und unterdrückt dabei die Proteintranslation in Zellextrakten (Campbell, Buckeridge et al. 2000). Außerdem ist das Z Protein an der Ausbildung des Ribonukleoprotein-Komplexes beteiligt. (Capul, de la Torre et al. 2011).

Zusammengefasst scheint das Z Protein in eine Vielzahl von viralen bzw. zellulären Prozessen involviert zu sein. Die Relevanz von diesen Interaktionen wird noch untersucht.

### L Protein

Bei dem L Protein handelt es sich mit über 2000 AS um das größte Protein des Lassa Fieber Virus (250 kDa), welches zusammen mit NP einen Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) (Fuller-Pace and Southern 1989) ausbildet. Das L Protein trägt ein für eine RNA-abhängige RNA-

Polymerase charakteristisches Sequenzmotiv, welches innerhalb der Negativ-Strang RNA Viren hoch konserviert ist (Lelke, Brunotte et al. 2010). Außer der Polymerase-Funktion sind bis jetzt keine weiteren enzymatischen Aktivitäten des L Proteins bekannt.

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) katalysiert die Transkription und Replikation der RNA-Viren und ist ein Hauptakteur im Lassa Fieber Virus Replikon-System (Hass, Golnitz et al. 2004). Im katalytischen Zentrum der Polymerase liegen hoch konservierte Aspartat-Reste, welche die katalytisch wichtigen  $Mg^{2+}$ -Ionen koordinieren. Die Struktur viraler RdRP ist nicht vollständig aufgeklärt (Brunotte, Lelke et al. 2011).

### Glykoproteine

Das Glykoprotein des Lassa Fieber Virus gehört zu der Gruppe der Typ-1-Membranproteine, ist 491 Aminosäuren lang (76 kDa) und enthält 11 potenzielle N-Glykosylierungsstellen (Eichler, Lenz et al. 2006). Das kleine Genomsegment kodiert den Glykoproteinvorläufer PräGPC am 5'-Ende in positiver Orientierung, welcher in ein Signalpeptid und GPC gespaltet wird (Schlie, Strecker et al. 2010). Nach einer weiteren Reifespaltung des GPC entstehen die Untereinheiten GP1 und GP2, wobei GP1 als Rezeptorbindepartner und GP2 als Membrananker fungieren (Abb.: 4).

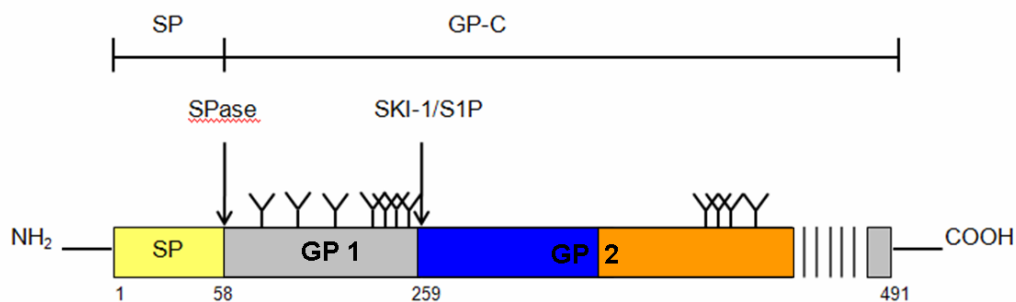


Abbildung 4: **Schematische Darstellung des Glykoproteinvorläufers präGPC.** Spaltung des präGPC in GP1 (N-terminale Untereinheit) und GP2 (C-terminale Untereinheit) durch SKI-1/S1P; Y: potenzielle N-Glykosylierungsstellen; SP- Signalpeptid (modifiziert nach Eichler et al. 2003).

Klassischerweise finden sich Signalpeptide (SP) bei Proteinen, deren Bestimmungsort in Biomembranen bzw. in Kompartimenten liegt. Dabei hat die Signalsequenz eine Länge von 15 bis 50 Aminosäuren und befindet sich am N-Terminus eines Proteins. Aber auch innerhalb eines Moleküls sowie am C-Terminus lassen sich Signalsequenzen identifizieren. Sie umfassen drei Regionen inklusive eines hydrophoben Kerns (7-10 AS). Der polare N-terminale Bereich ist meistens positiv geladen, die C-terminale Region enthält die Schnittstelle für die Signalpeptidase. Die Erkennung des Signalpeptides erfolgt während der Translation am Ribosom durch der Signalerkennungspartikel (SRP), einen Ribonukleoprotein-Komplex aus sechs Proteinen und einem RNA-Molekül (Keenan, Freymann et al. 2001). Durch Wechselwirkung zwischen SRP mit dem SRP-Rezeptor, dem Sec61-Komplex und dem TRAM Protein erfolgt der Transport des SPs zur ER-Membran (Wolin and Walter 1993; Raiborg and Stenmark 2009). Anschließend wird die

Signalsequenz durch die Signalpeptidase cotranslational abgetrennt und die Translation des Proteins in das Lumen des ER fortgesetzt (Halic, Becker et al. 2004). Die Abspaltung des SP kann aber auch in späteren Stadien der Proteinreifung folgen, was bereits bei HIV beobachtet wurde (Li, Bergeron et al. 1996; Rehm, Stern et al. 2001).

Beim Lassa Fieber Virus befindet sich das Signalpeptid am N-Terminus des primären Translationsproduktes Prä-GPC und besteht aus einer atypisch langen Sequenz mit 58 AS-Resten. Diese Sequenz weist zwei hydrophobe Bereiche auf (Eichler, Lenz et al. 2003), wobei die N-terminal gelegene hydrophobe Domäne verantwortlich für die GPC Translation ins ER ist. Die Abspaltung des Signalpeptids findet im ER durch die Signalpeptidase statt und ist erforderlich für die weitere Prozessierung von GPC in GP1 und GP2 (Schlie, Strecker et al. 2010). Die Signalsequenz bleibt danach mit GPC assoziiert. Das abgespaltene Signalpeptid weist eine außergewöhnlich lange Halbwertszeit ( $t_{1/2}=6h$ ) auf, was auf eine weitere Funktion bei der Proteintranslokation im ER hinweist. Auch die Wechselwirkung der freigesetzten Sequenz mit GPC zeichnet sich durch eine lange Halbwertszeit aus (Eichler, Lenz et al. 2003). Diese Daten deuten darauf hin, dass das Signalpeptid eine zusätzliche Funktion im viralen Lebenszyklus ausübt.

Bei der Proteinreifung eines LCMV wurde demonstriert, dass das SP nur von einem geringeren Teil der Prä-GPC-Vorläufer abgetrennt wird. Eine beträchtliche Anzahl an Glykoproteinmolekülen behält die Sequenz bei und akkumuliert diese in virale Partikel (Froeschke, Basler et al. 2003).

Nach der cotranslatorischen Abspaltung des Signalpeptids wird das GPC, ein 70-80 kDa großes Polyprotein, durch die Endoprotease SKI-1/S1P, zugehörig zur Pyrolysin-Gruppe der Subtilase, in das N-terminale Glykoprotein 1 und das C-terminale Glykoprotein 2 prozessiert. Die Reifung des GPC erfolgt im ER 60 min nach der Translokation (Lenz, ter Meulen et al. 2001).

Das periphere GP1 (Abb.: 5) besteht beim Lassa Fieber Virus Josiah aus 201 AS (GP-AS 59-259), enthält sieben N-Glykosylierungsstellen an den Asparagin-Resten und wird durch Disulfidbrücken stabilisiert (Eichler, Lenz et al. 2006). Des Weiteren sind die GP1 Moleküle durch ionische Wechselwirkungen mit dem GP2-Glykoproteinkomplex verbunden (Burns and Buchmeier 1991). Innerhalb des GP1 Proteins befindet sich die Rezeptorbindestelle (Kunz, Borrow et al. 2002; Rojek, Sanchez et al. 2008). Als Rezeptor fungiert ein peripheres Membranprotein,  $\alpha$ -Dystroglykan, welches nicht kovalent an das membranassoziierte  $\beta$ -Dystroglykan gebunden ist (Cao, Henry et al. 1998; Kunz, Rojek et al. 2005). Die Wechselwirkung zwischen Rezeptor-bindender Domäne und  $\alpha$ -Dystroglykan kann durch die so genannte Rezeptoid-Antikörperfragmente inhibiert werden (Kunz 2009). Dabei blocken solche Fragmente die Bindungsstelle für Laminin und LASV am  $\alpha$ -Dystroglykan, wodurch die Viren nicht mehr andocken und die Zellen nicht infiziert werden können (Kunz, Calder et al. 2004).

Die membranverankerte GP2 Untereinheit vermittelt die Fusion der viralen Hülle mit der zellulären Membran und gewährleistet somit den Eintritt in die Zelle. GP2 besteht aus der aus der



Membran herausragenden N-terminalen Region (Ektodomäne), einem transmembranen Bereich und einem hoch basischen C-Terminus, welcher ca. 40 AS lang ist.

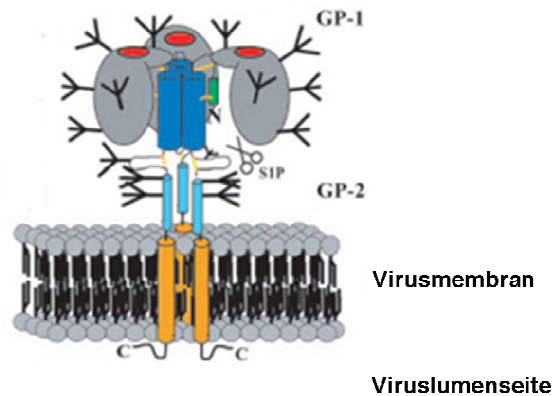


Abbildung 5: **Darstellung eines reifen Trimers bestehend aus GP1 und GP2** in der Virusmembran (modifiziert nach Eschli et al. 2006).

Die Strukturanalysen zeigen das Vorhandensein von zwei antiparallelen Helices innerhalb von der Ectodomäne, welche vermutlich für Trimerisierung verantwortlich sind (Gallagher, DiSimone et al. 2001). Die beiden Helices induzieren bei der Infektion als Folge von pH-Änderung strukturelle Umlagerungen des GP2 Moleküls und bilden eine Sechshelix-Bündel-Struktur aus. Zwischen beiden Helices liegen ein stark glykosylierter Bereich (4 N-Glykosylierungsstellen), eine Disulfidbrücke und ein B-Zell-Epitop. Das am N-Terminus liegende hydrophobe Peptid wurde als Fusionspeptid determiniert (Glushakova, Lukashevich et al. 1990; Glushakova, Omel'ianenko et al. 1991). Glykoproteine bilden Trimere aus (Abb.: 5), welche den globulären Kopfteil der elektronenmikroskopisch sichtbaren Glykoprotein-Spikes formen (Eschli, Quirin et al. 2006).

### 1.1.3. Viruseintritt in die Zelle

Der Eintritt des Lassa Fieber Virus erfolgt nach rezeptorvermittelter Endozytose und anschließender Fusion, wobei zuerst eine pH-induzierte Konformationsänderung des GPs stattfindet (Rojek, Sanchez et al. 2008; Cosset, Marianneau et al. 2009). Durch diese Umlagerung der GP2 Untereinheit entsteht die für die Fusion benötigte Energie (York, Agnihothram et al. 2005; York and Nunberg 2006).

#### 1.1.3.1. Zellulärer Rezeptor

Als zellulärer Rezeptor dient das periphere Membranprotein alpha-Dystroglykan ( $\alpha$ -DG), welches nicht kovalent an das integrale Membranprotein beta-Dystroglykan ( $\beta$ -DG) gebunden ist (Cao, Henry et al. 1998).  $\alpha$ -DG interagiert mit Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), während  $\beta$ -DG mit dem Signaltransduktionsnetzwerk wechselwirkt.  $\alpha$ -DG wird durch eine posttranslationale Glykosylierung, die so genannte O-Mannosylierung, modifiziert (Barresi and Campbell 2006). Diese Modifikation ist eine Voraussetzung sowohl für die Wechselwirkung mit ECM als auch für das Andocken des Lassa Fieber Virus Glykoproteins 1 (Kunz, Calder et al.



2004). Über die Interaktion zwischen  $\alpha$ -DG und Laminin-1 und -2 sowie Agrin und Perlecan werden Zellen in der Matrix verankert (Winder 2001). Der Dystroglycan-Komplex ist in vielen Geweben vorzufinden und stellt somit einen idealen Kandidaten als Rezeptor für Pathogene dar.

### **1.1.3.2. Rezeptorbindung und Fusion**

Während des Andockens an eine Zelle konkurrieren Glykoproteine des LASV mit Laminin um die Bindungsstelle an  $\alpha$ -Dystroglykan, da diese sich überlappen. Dies kann die bei der Erkrankung auftretenden physiologischen Erscheinungen wie Blutungen erklären, da die ECM-Komponenten möglicherweise verdrängt werden, was zu der Störung der Zelladhäsion führen kann (Oldstone and Campbell 2011; Hara, Balci-Hayta et al. 2011). Durch die Bindung des Glykoproteins 1 an  $\alpha$ -DG entsteht ein nicht von Clathrin-umhülltes Vesikel (Borrow and Oldstone 1994). Dies steht zwar in einem Widerspruch zur klassischen virusinduzierten Endozytose, wobei Clathrin-umhüllte Partikel gebildet werden, ist aber bei der Größe und Form eines Lassa Fieber Virus zu erwarten. Die Clathrinhülle beschränkt die Größe von umhüllten Vesikeln auf ca. 100 nm, während der Durchmesser der Lassa Virionen zwischen 100 und 150 nm liegt und somit über die vorgegebene Größe hinaus geht. Wie die Internalisierung der Virionen in Vesikel genau erfolgt ist noch unklar, allerdings geht man davon aus, dass das Virus sich die zelluläre Maschinerie um Dystroglykan (Signaltransduktionsmoleküle Grb2 sowie die Zytoskelettproteine Dystrophin und Utrophin) zu Nutze macht (Kunz, Sevilla et al. 2001). Durch die Ansäuerung des inneren Milieus in Vesikeln auf einen pH-Wert von 5,3 wird eine Konformationsänderung bzw. Dissoziation des GP1 vom GP2 und im nächsten Schritt die Freisetzung des Fusionspeptides von GP2 ausgelöst (Di Simone, Zandonatti et al. 1994; Di Simone and Buchmeier 1995). Anschließend kommt es zur Freisetzung des viralen Nukleokapsids aus dem Vesikel in das Zytoplasma und zum Start der Replikation sowie Translation im Zytoplasma.

### **1.1.4. Replikationszyklus**

Das Genom des Lassa Fieber Virus besteht aus zwei Segmenten einzelsträngiger RNA, wobei diese Genomabschnitte eine ambisense Orientierung aufweisen. Die Endsequenzen sind konserviert und umfassen die Promotoren für Transkription sowie die für die Replikation wichtigen Kontrollelemente. Die kodierenden Bereiche werden durch intergenische Regionen (IGR) voneinander getrennt. Die genomische RNA besitzt im Gegensatz zum retroviralen Genom (Berkhout, Arts et al. 2011) und zur zellulären mRNA kein 5'-Cap (Qi, Lan et al. 2010). Der Replikationsverlauf ist nicht vollständig aufgeklärt (Abb.: 6).

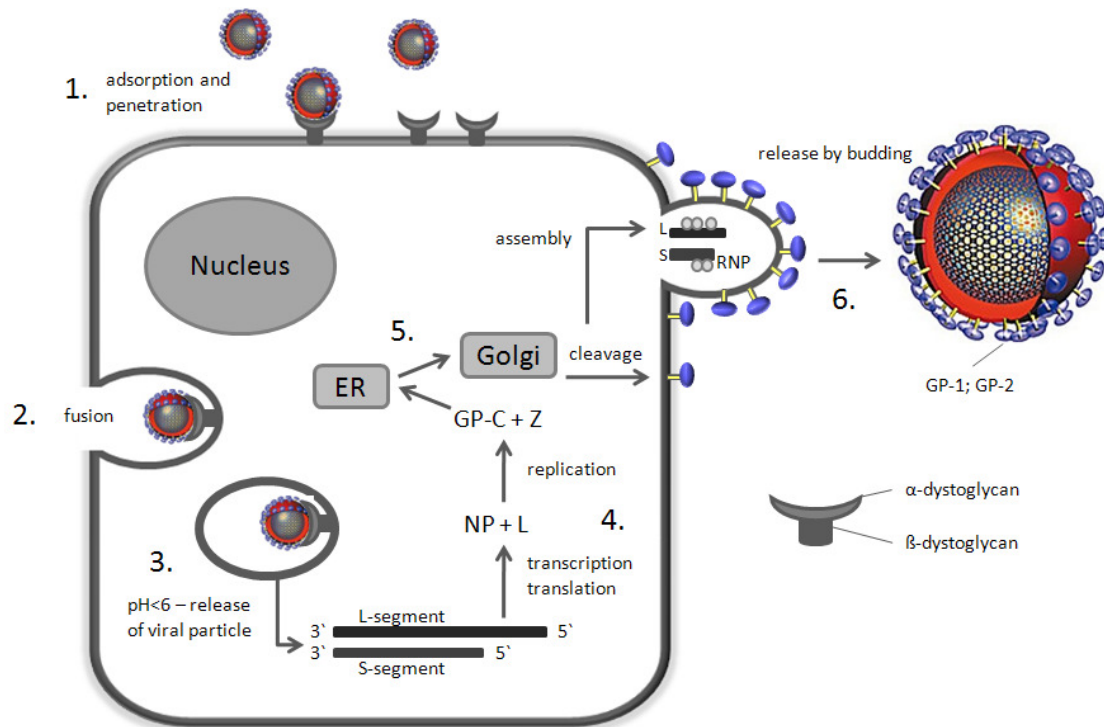


Abbildung 6: **Replikationszyklus eines Arenavirus.** ER - Endoplasmatisches Retikulum; GPC - Glykoproteinvorläufer; Z - Matrixprotein; NP - Nukleoprotein; L - RNA-abhängige RNA-Polymerase; (modifiziert nach Juan D. Rodas et al. 2006; Diplomarbeit von Bianca Gilbert).

Die Fusion zwischen viraler und zellulärer Membranen führt zur Freisetzung des viralen RNP-Komplexes, an welchem die L-Polymerase verankert ist. Im ersten Schritt werden NP und L Gene (negative Orientierung) transkribiert, wobei am 5'-Ende der mRNA Cap-Gruppen entstehen. Man geht davon aus, dass dies durch das so genannte *cap-snatching*: Stehlen der 5'Cap-Strukturen von zellulärer mRNA, erfolgt (Shih, Nemeroff et al. 1995; Shih and Krug 1996). Das gleiche Vorgehen wird bei den Bunya- und Orthomyxoviren beobachtet (Qi, Lan et al. 2010). Die Transkription wird am Loop der intergenischen Region abgebrochen. Anschließend werden die Transkripte an den Ribosomen in entsprechende Proteine translatiert.

Im nächsten Schritt erfolgt die Bildung der antigenomischen RNA, welche als Template für die Synthese von GP und Z Protein dienen. Die Synthese der Glykoproteine findet an der Membran des ER statt. Anschließend entstehen durch die Wechselwirkung zwischen Z, NP und GP-Proteinen die primären Budding-Strukturen.

### 1.1.5. Antivirale Therapie

Als einziges zugelassenes Medikament zur Behandlung vom Lassa Fieber wird Ribavirin (1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamin) eingesetzt (Handelsnamen Virazol, Virazid, Rebetol). Bei dem 1972 entdeckten Wirkstoff handelt es sich um ein Guanosinanalogon, welches in der Lage ist, die Replikation zahlreicher DNA- und RNA-Viren zu inhibieren. Dabei wird Ribavirin in Zellen zu Ribavirin-Monophosphat (RMP) phosphoryliert, welches während der viralen Genomreplikation in die virale RNA als ATP- oder GTP-Analogon eingebaut wird (Mendenhall,

Russell et al. ; McCormick, King et al. 1986; Crotty and Andino 2002; Vo, Young et al. 2003; Gowen, Wong et al. 2007). Der genaue Wirkungsmechanismus der Arznei ist nicht vollständig aufgeklärt und wird momentan intensiv untersucht (Olschlager, Neyts et al. 2011). Die tägliche Ribavirindosis beträgt 3,6 g. Es wurde demonstriert, dass die Therapie mit Ribavirin meistens dann erfolgreich anschluss, wenn ein Patient in den ersten sechs Tagen nach Beginn des Fiebers das Medikament verabreicht bekam (Dvoretskaia, Evseev et al. 1990; Dvoretskaia, Bogatikov et al. 1991).

### **1.1.6. Epidemiologie, Pathogenese und Klinik des Lassa Fiebers**

Lassa Fieber Virus ist ein Vertreter der Altwelt-Arenaviren und endemisch in Westafrika. Zu den klassischen Epidemieregionen gehören Nigeria, Liberia, Guinea und Sierra Leone (WHO), aber auch in Ghana, Burkina Faso und der Elfenbeinküste konnte das Virus diagnostiziert werden. Es kommt immer wieder zu Fällen von Lassa Fieber in Europa und den USA, allerdings handelt es sich hierbei um importierte Infektionen (Monath 1973; Gunther, Emmerich et al. 2000; Macher and Wolfe 2006). Ein epidemieartiger Ausbruch des Lassa Fieber Virus ereignete sich in Sierra Leone, wobei 153 Personen von insgesamt 823 Infizierten an den Folgen der Infektion starben (CDC, WHO, 1997).

Als natürliches Reservoir gilt die Ratte *Mastomys natalensis*, welche eine asymptomatische, persistierende Infektion zeigt. Das Virus wird mit Körperausscheidungen des Tieres freigesetzt. Infolge der Vergesellschaftung der Nager kommt es zu einer häufigen Kontamination der Lebensräume sowie der Lebensmittel vom Menschen durch die virushaltigen tierischen Exkremente. Des Weiteren kann eine Übertragung über Tröpfcheninfektion und durch Sekrete direkte von Mensch zu Mensch während der virämischen Phase stattfinden.

40-80 % aller Lassa Fieber Virus Infektionen verlaufen asymptomatisch. Ca. 15 % aller hospitalisierten Patienten sterben (Johnson, McCormick et al. 1987; McCormick, Webb et al. 1987). Die Verbreitung der Viren im Körper erfolgt über das Lymphsystem. Dadurch können hohe Virustiter in Leber, Milz sowie Nebennieren erklärt werden. Der Virustiter korreliert mit dem Sterbensrisiko der infizierten Menschen (Mahanty, Bausch et al. 2001). Jedoch verursacht die virale Replikation nicht direkt einen hämorrhagischen Schock und den Tod, sondern sie löst viel mehr die pathophysiologische Kaskade im Körper aus.

Die Inkubationszeit bei einer Erkrankung kann bis zu 21 Tage dauern, im Durchschnitt beträgt sie aber ca. 10 Tage. Der Krankheitsbeginn zeichnet sich durch die auch für Malaria typischen Symptome wie Kopf-, Hals- und Gelenkschmerzen aus. Im weiteren Verlauf der Infektion bilden sich Ödeme der Augenlider und des Gesichtes, die Muskelschmerzen nehmen zu, dazu kommen Husten, Hypotonie, Übelkeit und Erbrechen. Die erhöhten Aspartat-Aminotransferase (AST) Werte sowie AST/Alanin-Aminotransferase (ALA) Werte deuten auf eine Schädigung der Leber

hin (Callis, Jahrling et al. 1982; McCormick, Walker et al. 1986; Fisher-Hoch, Mitchell et al. 1987). Die Körpertemperatur erreicht 39 - 41 °C und es kommt in manchen Fällen zu Blutungen, welche auf die Schwächung der endothelialen Zellen durch Zytokinfreisetzung infizierter Makrophagen oder durch direkte Infektion mit dem Lassa Fieber Virus zurückzuführen sind (Schnittler and Feldmann 2003; Aleksandrowicz, Wolf et al. 2008). Die erhöhten Interleukin 8 sowie die Interferon-induzierten Protein 10 (CXCL10) Werte konnten in Patienten mit nicht fatalem Lassa Fieber demonstriert werden, während ein niedriges Level oder die Abwesenheit dieser Mediatoren mit einer sehr schlechten Prognose korreliert (Mahanty, Bausch et al. 2001).

Auch das Nervensystem kann von der Lassa Fieber Virus Infektion betroffen sein. Da das Dystroglykan in hoher Konzentration in der Membran der Schwannschen Zellen vorliegt, stellen diese ein perfektes Target für die Viren dar (Rambukkana, Kunz et al. 2003).

Die frühzeitige Diagnostik von Lassa Fieber ist durch die unspezifischen Symptome erschwert. Besonders im frühen Stadium der Infektion unterscheidet sich das Krankheitsbild nicht von dem der in Afrika weit verbreiteten Malaria. Klassischerweise erfolgt der Virusnachweis mittels RT-PCR. Eine weitere Möglichkeit stellt ein ELISA-Test dar (Emmerich, Thome-Bolduan et al. 2006). Allerdings werden beim Verdacht auf Lassa Fieber diese Tests aufgrund der hohen Pathogenität der Lassa Viren nur unter strengen Sicherheitsvorkehrungen (BSL4-Labor) durchgeführt. Des Weiteren sind diese Tests weder standardisiert noch kommerziell erhältlich.

### ***1.1.7. Immunantwort gegen das Lassa Fieber Virus***

Die Mechanismen der Immunantwort gegen das Lassa Fieber Virus sind nur wenig aufgeklärt. Es sind verschiedene zum Teil widersprüchliche Hypothesen (Mahanty, Bausch et al. 2001; Schmitz, Kohler et al. 2002) über die durch den Pathogen ausgelösten Reaktionen aufgestellt worden. Allerdings kann mit Sicherheit postuliert werden, dass das Lassa Fieber Virus eine persistierende Infektion auslöst und das Immunsystem des Wirtes daran hindert, den Erreger zu eliminieren. Während einer solchen Infektion nisten sich die infektiösen Agenten in den Zellen des Immunsystems ein und verursachen eine Dysfunktion sowie Zerstörung der Zellen direkt oder indirekt durch das Auslösen immunpathologischer Mechanismen. Dies führt zu Suppression des ganzen Immunsystems (Sevilla, Kunz et al. 2000a; Sevilla, Kunz et al. 2003b).

#### ***1.1.7.1. Zelluläre Antwort***

Über das ubiquitäre  $\alpha$ -Dystroglykan kann das Lassa Fieber Virus die Zellen des Immunsystems befallen und eine zelluläre und humorale Immunsuppression auslösen. So konnte demonstriert werden, dass das Lassa Fieber Virus in Monozyten/Makrophagen sowie in dendritischen Zellen repliziert ohne dabei die Zellen zu zerstören. Diese Infektion führt zur Freisetzung der Virione, jedoch nicht zu einer Aktivierung der Zellen (Hensley, Smith et al. ; Lukashevich, Maryankova et al. 1999; Baize, Kaplon et al. 2004). So blieb das Niveau des TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  während einer

Studie mit Lassa Fieber-Erkrankten bei Patienten mit einer fatalen Infektion unverändert (Mahanty, Bausch et al. 2001). In einem anderem importierten Lassa Fieber-Fall mit einem ebenso tödlichen Ausgang konnte kurzfristig eine Erhöhung der beiden Werte gemessen werden (Schmitz, Kohler et al. 2002). Es kann davon ausgegangen werden, dass beide Mediatoren nur in einem kleinen Prozentsatz der Patienten mit fatalem Lassa Fieber oder während eines sehr kurzen Zeitfensters vor dem Tod freigesetzt werden. Weder pro-inflammatorische Interleukine wie IL-1b, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 noch ko-stimulierende Moleküle wie CD40, CD80, CD86 werden sekretiert (Mahanty, Hutchinson et al. 2003). Betreffend IL-8 konnte gezeigt werden, dass dessen Erhöhung nur mit einer nicht fatalen Infektion korreliert (Mahanty, Bausch et al. 2001). In *in vitro* Experimenten konnte keine IL-8 Sekretion festgestellt werden (Lukashevich, Maryankova et al. 1999). Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass der Tropismus des Lassa Fieber Virus für die antigenpräsentierenden Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Suppression des Immunsystems sowie die Pathogenität ausübt (Flatz, Hegazy et al. 2010).

Wie die Studien mit einer Vakzine-induzierten Immunität gegen Lassa Fieber Virus demonstrieren, kontaktieren während der persistierenden Infektion die T-Zellen mit den Lassa Fieber Virus Epitopen, welche auf der Oberfläche der infizierten Monozyten/Makrophagen sowie dendritischen Zellen in Kontext von MHC-I und MHC-II präsentiert werden (Geisbert, Jones et al. 2005). Vor allem die im MHC-I eingebundenen Epitope spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion der CD8+-T-Lymphozyten und somit bei der Kontrolle der viralen Infektion. Auch die CD4+-T-Lymphozyten Antwort konnte in einem weiteren Experiment mit einer auf LCMV basierenden Vakzine ausgelöst werden (Flatz, Hegazy et al. 2010). Des Weiteren wurde eine starke CD4+-Gedächtnis-T-Zell-Antwort gegen das Nukleoprotein NP und das Glykoprotein GP2 in seropositiven Probanden aus endemischen Regionen gezeigt, wobei die Infektion 6 Jahre zurück lag (ter Meulen, Badusche et al. 2000; Meulen, Badusche et al. 2004). Anschließend aktivieren die ko-stimulierenden T-Zell Zytokine die weiteren Akteure des Immunsystems.

#### **1.1.7.2. Humorale Antwort**

Zwar ist die Kontrolle der viralen Infektion primär mit einer zellulären Immunantwort assoziiert, jedoch zeigen einige Studien in nicht humanen Primaten die protektive Wirkung von neutralisierenden Antikörpern in Postexpositions-Prophylaxe und während einer Lassa Fieber Infektion. Bereits in den 80er Jahren konnte die protektive Effizienz des neutralisierenden Plasmas demonstriert werden. Im Rahmen einer Studie wurden mit Lassa Fieber infizierte Affen mit *Rekonvaleszenten*-Plasma ("Blutserum von genesenen Primaten") therapiert. Die Tiere, welche ein unverdünntes Plasma erhielten, überlebten die Infektion (Jahrling and Peters 1984). Auch im Falle einer LCMV Infektion bei Mäusen konnte die Viruslast nach der Verabreichung neutralisierender Antikörper reduziert werden. Zudem wurde der regulierende Effekt der Antikörper auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort demonstriert (Wright and Buchmeier 1991;

Baldrige, McGraw et al. 1997). In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass die mit Muttermilch übertragenen Antikörper, vor allen IgG2a die Nachkommen vor einer erneuten Infektion schützen (Baldrige and Buchmeier 1992).

Eine akute Lassa Fieber Infektion löst zwar die Produktion der IgM und IgG Antikörper aus, jedoch lässt sich keine Korrelation zwischen erhöhtem Antikörpertiter im Blut und einer Viruslastreduktion feststellen. Dies deutet darauf hin, dass die frühen Antikörper keine neutralisierenden Eigenschaften aufweisen. Dennoch zeigen die bindenden Antikörper einen inhibitorischen Einfluss auf die Virusverbreitung im Körper (Hangartner, Zellweger et al. 2006).

Tatsächlich erscheinen die neutralisierenden Antikörper erst Monate später nach einer akuten Infektion und deren Titer erhöht sich oder bleibt konstant in den nächsten 5 Jahren nach Konvaleszenz (Baize, Marianneau et al. 2009). Dies kann auf eine permanente B-Zell-Stimulation zurückzuführen sein, welche durch eine virale Persistenz auf einem sehr niedrigen Niveau ausgelöst wird. Grundsätzlich ist der Antikörpertiter relativ niedrig verglichen mit anderen viralen Infektionen und hängt vom jeweiligen Stamm ab (Gunther and Lenz 2004).

Die ungewöhnliche Kinetik der neutralisierenden Antikörper ist im Wesentlichen auf virale Antigene zurückzuführen. Dabei weisen sich die viralen Glykoproteine als der limitierende Faktor für die Entwicklung der spezifischen Antikörper auf. Verglichen mit anderen Viren, wie HIV, welches nur bis 15 Envelope-Moleküle auf der Oberfläche zeigt, befinden sich auf einem Lassa Virion bis zu 1500 GP-Spikes. Diese hohe GP-Dichte und der damit assoziierte Glykan-Schutzschild stellen die molekularen Mechanismen dar, welche eine effektive Antikörper-vermittelte Virusneutralisation verhindern (Pinschewer, Perez et al. 2004).

Der zweite Grund für die Suppression der Antikörperproduktion besteht darin, dass die B-Zellen nicht über Antigen-präsentierende Zellen aktiviert werden können, da die Letzteren durch den immunopathologischen Einfluss der virus-spezifischen CD8-T-Zellen in ihrer Funktion beeinträchtigt sind (Planz, Seiler et al. 1996). Die Destruktion von Makrophagen und dendritischen Zellen erfolgt in der Marginalzone in Milz und Lymphknoten durch die Freisetzung von TNF- $\alpha$ , interleukin 10 und *transforming growth factor A* (Odermatt, Eppler et al. 1991), wobei zu betonen ist, dass einige weitere Studien keinen inhibitorischen Effekt des anti-TNF- $\alpha$ -Serums auf die durch TNF- $\alpha$  ausgelöste Suppression zeigen konnten. Auch bei den Patienten konnte keine eindeutige Korrelation zwischen TNF- $\alpha$ -Level und Sterberisiko festgestellt werden (Mahanty, Bausch et al. 2001; Schmitz, Kohler et al. 2002). Interessant ist, dass der negative Einfluss von spezifischen CD8-T-Zellen nur für die neutralisierende Antikörper produzierenden B-Zellen beobachtet wird (Battegay, Moskophidis et al. 1993; Battegay, Kyburz et al. 1993; Recher, Lang et al. 2004).

Eine weitere Suppression der spezifischen B-Zellen erfolgt über die CD4/CD25 regulatorischen T-Zellen. Die dahinter stehenden Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Zwei Möglichkeiten werden in Betracht gezogen: eine direkte Suppression und Suppression über T-

Helferzellen (Lim, Hillsamer et al. 2005). Eine spätere Studie belegt, dass die späte Produktion der neutralisierenden Antikörper und die Viruspersistenz eng mit Aktivierung und Kinetik der Virus-spezifischen CD4-T-Zellen korreliert (Bergthaler, Flatz et al. 2009). Angenommen wird, dass die CD4-T-Zellen eine polyklonale B-Zell-Stimulation auslösen, wodurch die Produktion spezifischer neutralisierender Antikörper gehemmt wird.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass während hoch-affine neutralisierende Antikörper bei einer Virusinfektion mit lytischen Infektionsmodus (zytopathische Wirkung) den Haupteffektor des Abwehrmechanismus darstellen, wie im Falle von Tollwut- bzw. Polioviren, bieten die während der akuten Phase der Infektion produzierten Immunglobuline keinen ausreichenden Schutz. Dennoch sind die neutralisierenden Antikörper als passive Therapie eine Art Torhüter und ermöglichen dem Immunsystem des Wirtes, eine effiziente T-Zell vermittelte Antwort zu entwickeln.

### **1.1.8. Neue therapeutische Ansätze gegen das Lassa Fieber Virus**

Einen neuen Therapieansatz stellen die durch *high throughput screening* gewonnenen *Small Molecule* Entry-Inhibitoren dar, deren IC<sub>50</sub> Werte bei 500-800 nM liegen. Untersuchungen ergaben, dass diese Inhibitoren in der Lage sind, die pH-abhängige Fusion erfolgreich zu blockieren (Lee, Rojek et al. 2008; Whitby, Lee et al. 2009). Des Weiteren werden zurzeit so genannte amphipatische DNA Polymere entwickelt, welche die Interaktion zwischen  $\alpha$ -Dystroglykan und Glykoproteinen inhibieren (Lee, Rojek et al. 2008). Auch Endoprotease SKI-1/S1-Hemmer werden zu therapeutischen Zwecken gegen Lassa Fieber getestet (Urata, Yun et al. 2011; Beyer, Popplau et al. 2003; Majumdar, Chen et al. 2011). Allerdings finden die beschriebenen Ansätze noch keine Anwendung in der Klinik.

Das Ziel einer Vakzinentwicklung ist es, ein Antigen zu erschaffen, welches eine stabile T-Zell- aber vor allem eine Antikörper-Antwort hervorruft (Flatz, Hegazy et al. 2010; Pinschewer, Flatz et al. 2010). Die Studien zu potentiellen Vakzinen gegen Lassa Fieber Virus begannen um 1980. Bei den ersten Versuchen handelte es sich um mit Mopeia Virus infizierte Affen, welche eine Immunität gegen Lassa Fieber Virus entwickelten (Kiley, Lange et al. 1979). Das Mopeia Virus stellte eine ideale natürliche Vakzine dar, allerdings erschwerten die für die Arbeiten mit diesem Virus notwendigen hohen Sicherheitsbedingungen (BSL 3) deren Anwendung als erfolgreicher Schutz. Nachfolgend wurden inaktivierte Lassa Viren (Mitchell and McCormick 1984; McCormick, Mitchell et al. 1992), aber auch virale Strukturproteine, als Impfstoff eingesetzt (Fisher-Hoch, McCormick et al. 1989; Fisher-Hoch, Hutwagner et al. 2000). Es gelang jedoch nicht, eine auf Dauer robuste T-Zell- sowie Antikörperantwort hervorzurufen (Fisher-Hoch and McCormick 2001; Fisher-Hoch and McCormick 2004). Daher ist davon auszugehen, dass nur die *live* Vakzine in der Lage sind, eine effiziente Antigenpräsentation in dem Kontext von beiden MHC Klassen

auszulösen. Gerade das Fehlen der Klasse I Präsentation wird als eine mögliche Erklärung für das Scheitern von inaktivierten Viren bzw. Strukturproteinen bei der Induktion der protektiven Immunität herangezogen (Fisher-Hoch and McCormick 2001). Die Herstellung eines *live* Impfstoffes erfolgt entweder durch das so genannte Reassortment des genetischen Materials während der Ko-Infektion von Lassa und z. B. Mopeia Viren (Lukashevich, Patterson et al. 2005; Moshkoff, Salvato et al. 2007) oder durch das Auswechseln der viralen Glykoproteine (Branco, Grove et al. 2010; Fisher-Hoch, Hutwagner et al. 2000; Bergthaler, Gerber et al. 2006). Zwar konnten mit reassortierten Vakzinen einige Erfolge erzielt werden (Carrion, Patterson et al. 2007; Lukashevich, Carrion et al. 2008), jedoch ist die Anwendung solcher Impfstoffe angesichts der hohen Verbreitung der HIV-1 Infektionen in den endemischen Regionen mit Risiken verbunden. Als Plattform für die reverse Genetik dienen verschiedene nicht pathogene Vektoren wie VSV (Garbutt, Liebscher et al. 2004) oder LCMV (Bergthaler, Gerber et al. 2006), welche auf ihrer Oberfläche Lassa Fieber Virus Glykoproteine tragen. Die neuen Entwicklungen auf diesem Gebiet bieten eine Möglichkeit die Biologie dieses Virus zu erforschen und zu verstehen (Emonet, Urata et al. 2011). In einigen Studien wurde demonstriert, dass das Vorhandensein der intakten Glykoproteine ausschlaggebend für den Schutz vor Lassa Viren in verschiedenen Tiermodellen ist (Botten, Whitton et al. 2010; Rodrigo, de la Torre et al. 2010). Jedoch besteht bei dieser Methode die Gefahr einer unspezifischen Immunreaktion auf die Proteine bzw. Gene des Vektors. Daher ist dieses Verfahren nur auf die limitierende Anzahl der passenden GP-Träger eingeschränkt. Laut des heutigen Wissensstands wird keiner der oben genannten Ansätze weiter entwickelt. Trotz der zahlreichen Versuche, eine neue Therapie gegen Lassa Fieber zu entwickeln, ist es bis heute nicht gelungen eine preiswerte und risikofreie Methode zur Behandlung der Infektion zu etablieren. Umso wichtiger ist die Generierung der neutralisierenden und bindenden Antikörper, welche eine sichere Plattform für eine passive Therapie in akuten Krankheitsfällen darstellen (Geisbert, Jones et al. 2005)

## **1.2. Antikörper**

### **1.2.1. Antikörperstruktur und Expression von Antikörpergenen**

Antikörper entstehen in Rahmen der humoralen Immunantwort und gehören zum adaptiven Teil des Immunsystems und werden von B-Lymphozyten produziert. Es existieren fünf Klassen (Isotypen) von Antikörpern: IgA ( $\alpha$ ), IgD ( $\delta$ ), IgE ( $\epsilon$ ), IgG ( $\gamma$ ) und IgM ( $\mu$ ). Da die Antikörper an einigen Aminosäureresten Zuckerketten tragen, werden diese zu den Glykoproteinen gezählt. Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren (*heavy chains*, H) und leichten Ketten (*light chains*, L), welche durch kovalente Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Abb: 7). Die leichten Ketten sind aus jeweils einer variablen und einer konstanten Domäne zusammengesetzt, welche als  $V_L$  und  $C_L$  bezeichnet werden. Die schweren Ketten hingegen weisen eine variable und 3 (IgG, IgA) bzw. 4 (IgM, IgE) konstante Domänen auf. Diese werden analog  $V_H$  und  $C_H1$ ,



$C_H2$  und  $C_H3$  genannt. Die Verknüpfung zwischen  $C_L$  und  $C_H1$  erfolgt über Disulfidbrücken. Anhand der leichten Ketten werden zwei weitere Subklassen  $\kappa$  oder  $\lambda$  determiniert. Allerdings bestehen keine funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Klassen. Das Verhältnis zwischen  $\lambda$  und  $\kappa$  liegt beim Menschen bei 2:3 (Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S)

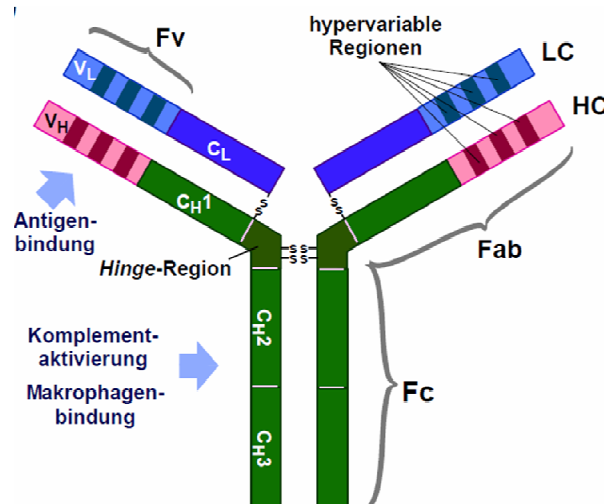


Abbildung 7: **Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers** (Schmiedl, A. & Dübel, S. 2004: Rekombinante Antikörper & Phagen-Display In: M. Wink. (Hrsg.): Molekulare Biotechnologie. Wiley-VCH).

Die leichten Ketten bilden zusammen mit den oberhalb der Gelenkregion (*hinge region*) liegenden Anteilen der schweren Ketten das antigenbindende Fragment *Fab*, welches enzymatisch von dem darunter liegendem *Fc* Fragment abgespalten werden kann. Die *Hinge Region* zeigt große räumliche Flexibilität, welche es den Antikörpermolekülen ermöglicht, weit auseinander liegende antigene Determinanten zu binden. Die variablen Domänen beider Ketten bilden die Antigenbindungsregion (*Fv*) des Antikörpers aus. Diese Proteinabschnitte weisen eine größte Variabilität an Aminosäuresequenzen auf und werden auch als „complementarily determining regions“ (CDR Komplementarität-bestimmende Regionen) bezeichnet (Griffiths, Malmqvist et al. 1993). Die Anzahl an Aminosäuren in diesen Regionen variiert zwischen 3 und 20. Die CDRs werden von den Gerüstbereichen (Framework-Regionen) getrennt und stabilisiert. Es existieren insgesamt sechs CDR-Regionen, welche sich in räumlicher Nähe zueinander befinden und eine stabile Struktur – Paratop- ausbilden. Diese ist komplementär zu dem entsprechenden Epitop eines Antigens. Der *Fc*-Teil eines Antikörpers ist nicht an der Antigenbindung beteiligt. Seine Funktion besteht darin, die schützenden Abwehrmechanismen des Immunsystems auszulösen. Ein IgG Antikörper ist ein Heterotetramer und weist eine molekulare Masse von ca. 150 kDa auf, wobei die schweren Ketten je 50 kDa und die leichten Ketten je 25 kDa schwer sind.

Insgesamt verfügt das Immunsystem über ein Arsenal von  $10^{10}$  Antikörpern. Allerdings stehen nur ca. 1000 Antikörpergene für die Generierung dieser Antikörpervielfalt zur Verfügung. Hier werden mehrere Mechanismen aktiviert, um aus einem begrenzten Genpool eine hohe

Antikörperdiversität abzuleiten. Der erste Schritt ist die Genkombination, wobei die einzelnen Gensegmente (V-, D- und J-Elemente) für die Antikörpermoleküle in einem Umlagerungsprozess zusammengebaut werden. Insgesamt existieren rund 320 für die leichte Kette und 8000 Genkombinationsmöglichkeiten für die schwere Kette. Summiert man die Variationen, kommt man auf 2,6 Millionen verschiedene Antikörper. Wird die Zahl der möglichen Verknüpfungsstellen der einzelnen Regionen in die Rechnung mit einbezogen, steigt die Summe der möglichen Antikörper auf 260 Millionen. Anschließend erfolgt während der Aktivierung eines B-Lymphozyten durch die spezifische Bindung an ein Antigen eine somatische Mutation. Diese B-Zelle wird selektiv vermehrt, wobei es bei jeder Zellteilung zu einer Punktmutation mit einer Häufigkeit von  $10^{-3}$  pro Basenpaar kommt (Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik).

### **1.2.2. Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente**

In den letzten zwanzig Jahren gelang es enorme Fortschritte bei der Selektion, dem molekularen Design und der Produktion der Antikörper zu erzielen. Dadurch entwickelten sie sich zu einer der wichtigsten Klassen therapeutischer Proteine (Dübel, S. & Kontermann, R.). Die ersten Versuche zur Immunisierung und Erzeugung verschiedener Immunglobuline unterschiedlicher Spezifität gehen auf 1890 zurück. Dabei beruhen diese früheren Methoden auf der Immunisierung von Versuchstieren. Allerdings ist die Anwendung solcher polyklonaler Seren für therapeutische Zwecke mit Risiken einer allergischen Reaktion verbunden. Die ersten monoklonalen Antikörper wurden mittels der in den 70-er Jahren entwickelten Hybridom-Technik hergestellt und fanden bereits einen breiten therapeutischen Einsatz. Allerdings verbergen sich auch hierbei technische Schwierigkeiten. Zum einen ist der Prozess der Antikörperisolierung sowie dessen Humanisierung sehr zeit- und kostenaufwendig. Zum anderen ist eine Immunreaktion auf ein solches chimäres Protein durch die Bildung humaner anti-Maus Antikörper (HAMA) immer zu erwarten. Des Weiteren unterscheidet sich die Antikörperstruktur der zur Immunisierung verwendeten Mäuse von der der menschlichen Immunglobuline, was einen entscheidenden Nachteil vor allem bei der Antikörperproduktion gegen virale Pathogene darstellt (Collis, Brouwer et al. 2003). Einen Ausweg bieten zurzeit neuartige Methoden, welche keine Tierimmunisierung benötigen. Es handelt sich dabei um kombinatorische Bibliotheken mit Antikörperfragmenten, welche auf der Oberfläche von Phagen, Hefen oder *E. coli* exprimiert werden (Ueda and Shibasaki 2010; Shibasaki and Ueda 2010; Wang and He 2007). Dabei kann mithilfe von molekularbiologischen Methoden das komplette Antikörpergen-Repertoire aus B-Lymphozyten sowohl immunisierter oder als auch nicht-immunisierter Spender isoliert und amplifiziert werden. Nach der Klonierung der Gene in einen entsprechenden Vektor werden die Antikörperfragmente exprimiert und als Fusionsproteine auf der Oberfläche eines Träger-Organismus präsentiert. Die Selektion der spezifischen Binder aus dem Antikörpergemisch erfolgt auf einem Antigen, welches auf einer Trägerplattform gebunden ist.

Durch die enzymatische Behandlung eines Antikörpers mit Papain bzw. Pepsin entstehen Fragmente, welche zum einen Antigen-bindende Bereiche besitzen, zum anderen die Stabilität der korrespondierenden Immunglobuline aufweisen. Dabei handelt es sich um aus der kompletten leichten Kette und dem  $V_H$ - und  $C_H1$ -Bereich der schweren Kette bestehende Fab (Liddell, E. & Weeks). Eine weitere Antikörpervariante stellt das Fv-Fragment dar, welches nur die variablen Regionen der beiden Ketten enthält (Abb.: 8). Zwar verfügen diese Fragmente über die Antigen-Bindungsstellen, verlieren aber im Vergleich zu den Fabs deutlich an Stabilität. Um die Stabilisierung solcher Antikörpervarianten zu gewährleisten, werden zwischen den Ketten Peptid-Linker aus 15 bis 20 hydrophilen Aminosäuren eingefügt (Bird, Hardman et al. 1988; Hudson and Kortt 1999).

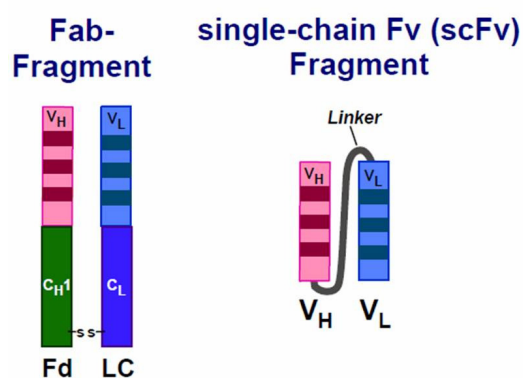


Abbildung 8: **Schematische Darstellung eines Fab-Fragments und scFv-Fragments** (Schmiedl, A. & Dübel, S. (2004): *Rekombinante Antikörper & Phagen-Display* In: M. Wink. (Hrsg.): *Molekulare Biotechnologie*. Wiley-VCH).

Dabei wird der C-Terminus von  $V_H$  mit dem N-Terminus von  $V_L$  verknüpft. Eine solche Kopplung der beiden Regionen stellte sich für die räumliche Anordnung des Fragments im Vergleich zu anderen Varianten als die günstigste heraus (Schmiedl, A. & Dübel, S. 2004). Die mit Polypeptidketten stabilisierten Fragmente werden als single chain Fragment-Variable (scFv) bezeichnet und rekombinant in verschiedenen Systemen erzeugt. Diese verkürzten Antikörperfragmente zeichnen sich im Vergleich zu herkömmlichen Antikörpern durch eine kürzere Halbwertszeit (Immunoglobulin Clearance: Ausscheidung über die Niere) und verbesserte Penetration von Organen aus (Beckman, Weiner et al. 2007). Sie werden bereits als Therapeutika eingesetzt. Mittels gentechnischer Rekombinationen können diese Fragmente miteinander kombiniert und neue dia-, tria-, tetrabodies erzeugt werden, wodurch die Valenz und so mit die Avidität eines Antikörpers verbessert wird (Todorovska, Roovers et al. 2001). Bei Bedarf können scFv Fragmente mit einem Fc-Teil eines humanen Antikörpers fusioniert werden, wobei Effektorfunktionen vermittelt werden.

### 1.3. Antikörper Phage-Display Technologie

Wie bereits erwähnt, gewannen in den letzten 25 Jahren neuartige leistungsfähige Methoden zur Antikörpergewinnung (Lipovsek and Pluckthun 2004), darunter Phage Display, immer mehr an Bedeutung. Zum einen bedarf dieses Verfahren keiner Tierversuche, zum anderen gleicht die Antikörperdiversität der in Display-Technologien eingesetzten Bibliotheken der des natürlichen

Immunsystems. Zusätzlich ermöglicht die Kopplung von Genotyp mit Phänotyp in einem Partikel eine schnelle und präzise Selektion und Identifizierung von Antikörpern.

Phage Display wurde in den 80er Jahren entwickelt (Smith 1985). Die Grundlage dieser Methode bildet eine Bibliothek aus Bakteriophagen, welche an ihrer Oberfläche zusätzliche Segmente wie Peptide oder Antikörperfragmente als Fusionselemente mit eigenen Hüllproteinen exprimieren. Die genetische Information für diese Segmente wird mithilfe von molekularbiologischen Techniken in das Phagen genom integriert. Anschließend werden die Phagen in Bakterien vermehrt und nach ihren Eigenschaften selektiert.

### 1.3.1. **Aufbau von M13 Phagen**

Die Basis für das PhageDisplay Verfahren stellen die 1917 erstmals beschriebenen Bakteriophagen (kurz Phagen) dar. Dabei handelt es sich um Viren, deren Wirtsspektrum sich ausschließlich auf Bakterien beschränkt. Die im Phage-Display eingesetzten Bakteriophagen M13 mit ringförmiger ssDNA und dem Bakterium *E. coli* als Wirt sowie ihre Verwandten f1 und fd, gehören zur Familie der Inoviridae (Klasse Ff). Die DNA des Bakteriophagen M13, die 11 Gene codiert, ist von einer röhrenförmigen Proteinhülle umgeben, die aus ca. 2.700 helikal angeordneten identischen Untereinheiten des Hauptproteins VIII und dem in drei- bis fünffacher Kopie vorliegenden Protein III besteht (Abb.: 9).

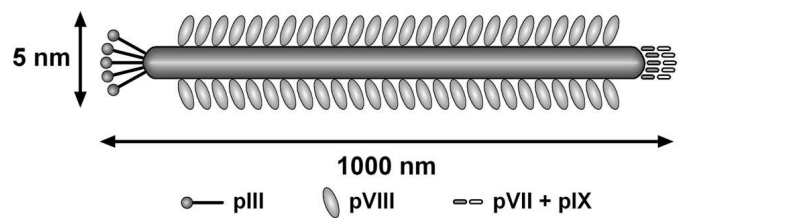


Abbildung 9: **Schematische Darstellung eines M 13 Phagen** (<http://www.springerimages.com/img/Images/Springer/.jpg>).

Das Hüllprotein pIII ist verantwortlich für die Bindung der Partikel an den Wirt und liegt am Kopfende (Webster, 2001). Die Gesamtgröße beträgt ca. 8 nm im Durchmesser und 860 nm in der Länge. Phagenpartikel sind robust gegenüber Trypsinverdau und erhöhter Temperatur (Breitling & Dübel, 1997).

M13 kann nur auf *E. coli*-Zellen wachsen, die einen Fertilitätsfaktor (F-Pilus) tragen, wodurch eine Injektion der Einzelstrang-DNA des Phagen M13 in den Wirt erfolgt. Diese Phagen verursachen keine Zelllyse bei Freisetzung der Phagenpartikel, sondern verlangsamen lediglich das Wachstum um ca. 50 % (Webster, 2001). Jede infizierte Wirtszelle setzt dabei pro Zellzyklus bis zu 200 Phagenpartikel frei.

### 1.3.2. Antikörperbibliotheken

Die Etablierung der rekombinanten Phage-Display Technologie ging mit der PCR basierten Entwicklung der Antikörpergen-Bibliotheken einher. Diese Bibliotheken stellen ein komplexes und möglichst vollständiges Antikörperrepertoire dar, welches für in vitro Selektion eingesetzt werden kann.

Für die Herstellung einer Antikörperbibliothek wird die RNA aus B-Lymphozyten eines Spenderorganismus isoliert, in cDNA transkribiert und mittels PCR vervielfacht. Anschließend erfolgt die Klonierung in ein geeignetes Phagemid-System und die Transformation von *E.coli*-Bakterien (Abb.: 10). Der Vorteil eines Phagemiden als Träger der genetischen Information liegt in einer höheren Transformationseffizienz verglichen mit dem M13-Phagengenom (Breitling, Dubel et al. 1991; Barbas, Kang et al. 1991).

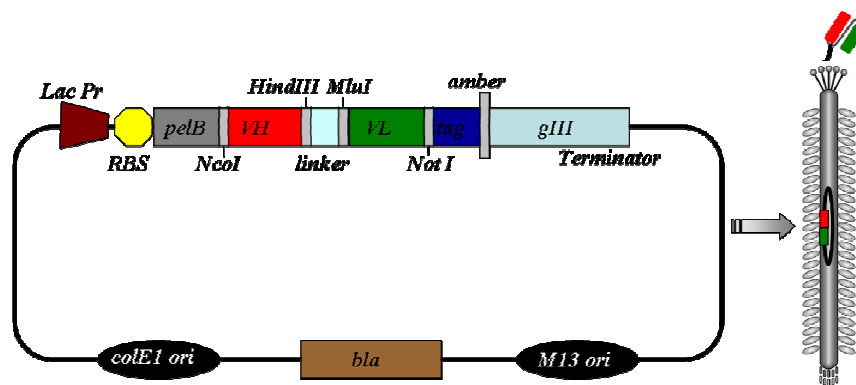


Abbildung 10: **Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten pHAL 14 Vektors mit  $V_H$  und  $V_L$  – Genen sowie eines scFv-präsentierenden Phagen.** Am N-Terminus befindet sich der lac-Promotor sowie die Signalsequenz für die periplasmatische Proteinexpression; am C-Terminus sind myc- und  $(His)_5$  Tags sowie die Gene für das Fusionsprotein pIII lokalisiert; *colE1 ori* und *M13 ori* stehen für zwei Replikationsursprünge.

Zur Verpackung der Phagemide werden die Bakterien mit einem Helferphagen infiziert. Danach liegt die Bibliothek in Form von Antikörperphagen vor. Die Komplexität einer Bibliothek kann je nach verwendetem Genrepertoire in einem Bereich von  $10^7$  bis  $10^{11}$  Einzelklone liegen (Sblattero, Lou et al. 2001; de Haard, van Neer et al. 1999). Grundsätzlich lassen sich Antikörperbibliotheken in zwei Arten unterteilen: immune und nicht-immune (single-pot) Bibliotheken (Abb.: 11) (Hust and Dubel 2004). Den Immunbibliotheken liegt die Amplifikation der variablen (V) Gene aus Plasmazellen von immunisierten Spendern zugrunde. Solche Spender hatten Kontakt mit einem bestimmten Antigen und weisen bereits spezifische affinitätsgeriffte IgG-Antikörper auf. Für die Erzeugung einer Immunbibliothek werden die V-Regionen der Immunoglobuline G mit spezifischen Primern amplifiziert (Clackson, Hoogenboom et al. 1991).

Merkmale	Synthetische Bibliothek	Naive Bibliothek	Immunbibliothek
<b>V-Gene Herkunft</b>	<b>Unrearrangierte V Gen-Segmente</b>	<b>Rearrangierte V Gene aus einem IgM Pool</b>	<b>Rearrangierte V Gene aus einem IgG Pool</b>
<b>Vorgang</b>	<b>kontrolliert</b>	<b>unkontrolliert</b>	<b>unkontrolliert</b>
<b>Konstruktions-Repertoire</b>	<b>Einmalig (Singel pot) für jedes beliebige Antigen</b>		<b>Neues Repertoire für jedes Antigen</b>
<b>Antikörperaffinität</b>	<b>Abhängig von der Bibliotheksgröße Repertoire <math>10^7</math> (<math>\mu</math>M) bis <math>10^{10}</math> (<math>\mu</math>M)</b>		<b>Hohe Affinität gegen spezifisches Antigen (nM)</b>
<b>Spezifität</b>	<b>Beliebig</b>	<b>spezifisch</b>	<b>Spezifisch</b>

Abbildung 11: **Zusammenfassung der Eigenschaften der Antikörperbibliotheken** (modifiziert nach Hoogenboom et al. 1997).

Die Vorteile einer solchen Bibliothek sind hohe Spezifität und Affinität zu bestimmten Antigenen bei einer vergleichsweise geringeren Diversität.

Die nicht-immunen oder Single-Pot Bibliotheken zeichnen sich durch eine hohe Diversität aus und werden je nach Herkunft der Antikörpergene in naive, semi-synthetische und synthetische Bibliotheken klassifiziert (Hoogenboom 1997). Für solche Bibliotheken wird das IgM-Genrepertoire aus B-Lymphozyten nicht immunisierter Spender isoliert und amplifiziert.

Bei den naiven Bibliotheken handelt es sich um rearrangierte V-Gene der IgM mRNA (cDNA) aus nicht immunisierten Spendern in unveränderter Form. Einer der Vorteile einer solchen Bibliothek äußert sich in ihrer universellen Verwendbarkeit, da sie zur Selektion von Antikörpern gegen beliebige Antigene eingesetzt werden kann (Griffiths, Malmqvist et al. 1993). Allerdings muss eine naive Bibliothek eine hohe Diversität aufweisen, was in einem hohen Aufwand bei der Produktion resultiert.

Semi-synthetische und synthetische Bibliotheken werden aus nicht-rearrangierten V-Genen der Keimbahnzellen oder aus einem einzelnen Antikörper-framework mit Modifikationen in den hypervariablen Regionen (CDRs) hergestellt (Knappik, Ge et al. 2000).

### **1.4. Selektion spezifischer Antikörperphagen (Biopanning)**

Nach der Erzeugung einer Bibliothek erfolgt die Selektion derjenigen Phagen aus dem Gemisch aller Partikel, welche die gewünschten Antikörperfragmente auf der Oberfläche präsentieren. Dieser Vorgang wird als Biopanning bezeichnet (Parnley and Smith 1988). Hierfür wird das Zielprotein an einen festen Träger, wie einer ELISA-Platte oder magnetischen Beads, immobilisiert (van den Brink, Ter Meulen et al. 2005; Hoogenboom 2005) und mit der Antikörperbibliothek über einige Stunden inkubiert. Danach erfolgen mehrere Waschschrte, wobei die ungebundenen Phagen entfernt werden.

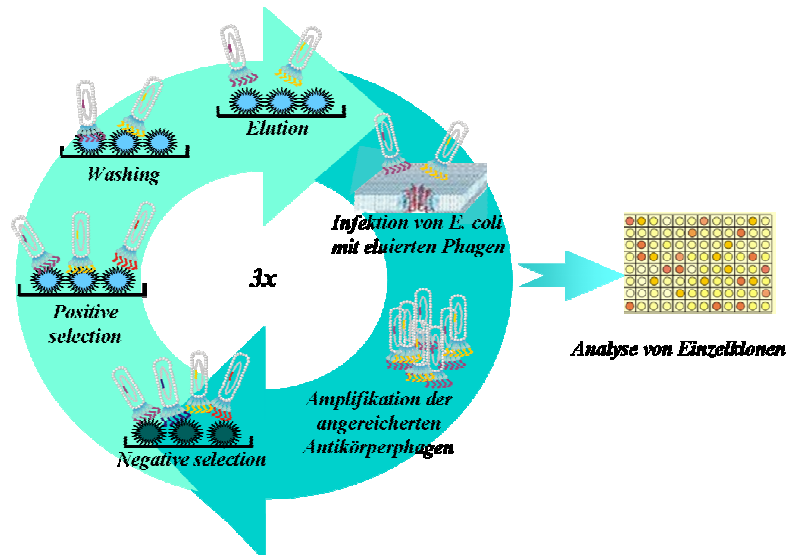


Abbildung 12: **Ablauf der Selektion spezifischer Antikörperphagen (Biopanning) - schematische Darstellung.** Die Phagen aus einer Antikörperbibliothek werden zuerst mit einem unspezifischen auf einer festen Phase gebundenen Protein inkubiert. Nach der Inkubation wird der Überstand auf das ebenfalls immobilisierte Zielprotein überführt. Nach einigen Waschschritten werden die spezifisch bindenden Phagen eluiert und durch Infektion von *E. coli*-Zellen amplifiziert. Darauf erfolgen die nächsten Selektionsrunden und anschließend eine Analyse der Bindungseigenschaften der Einzelklone.

Es ist empfehlenswert eine Präinkubation (negative Selektion) der Antikörperbibliothek mit einem weiteren Protein, welches ebenfalls auf einem Träger gebunden ist, durchzuführen, da dadurch die unspezifisch bindenden Partikel absorbiert werden können. Die gebunden Phagen werden mithilfe von Trypsin oder einer pH-Verschiebung eluiert und für die Infektion von *E. coli* Bakterien eingesetzt. Durch die Superinfektion der Bakterien mit Helferphagen können die Antikörperphagen amplifiziert und für weitere Runden des Biopanning verwendet werden (Abb.: 12). Um die spezifisch bindenden Antikörperfragmente zu selektieren und anzureichern, werden 2 bis 4 Selektionsrunden benötigt. Anschließend werden die einzelnen Klone isoliert und die bindenden bzw. neutralisierenden Eigenschaften der von ihnen produzierten Antikörperfragmente untersucht.

### **1.5. Produktion von Zielproteinen für Biopanning: lösliche Proteine und virale Partikel**

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für ein erfolgreiches Biopanning und die Selektion spezifisch bindender Liganden ist die richtige Auswahl des Targets. Dabei sollen die viralen Oberfläche-Proteine möglichst in einer intakten nativen Form vorliegen. Hierfür werden zwei Strategien angewendet. Zum einen werden virale Antigene als lösliche Proteine in Bakterien, Insekten bzw. Mammalia-Zellen exprimiert. Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass sich die produzierten Proteine nach der Aufreinigung und dem Aufkonzentrieren hervorragend an verschiedene Träger-Moleküle binden lassen. Solche Expressionssysteme sind bereits für HIV bzw. Influenza Proteine gut etabliert (Khurana, Larkin et al. 2011). Da die Biologie des Lassa



Fieber Virus verglichen mit anderen Pathogenen nun weniger gut aufgeklärt ist, wird zurzeit noch nach Möglichkeiten gesucht, lösliche Oberflächenproteine zu exprimieren (Illick, Branco et al. 2008). Ein anderer Weg besteht in der Herstellung kompletter nativer Viren, welche intakte Hüllproteine tragen. Allerdings werden die Arbeiten mit Lassa Fieber Viren dadurch eingeschränkt, dass diese nur unter strengen biologischen Sicherheitsstufen (S4) zu handhaben sind. Um dieses Problem zu umgehen wird ein System - Pseudotypisierung - zur Herstellung nicht replikationsfähiger Viren angewendet, welches es ermöglicht, die viralen Partikel mit nativen dimeren GP-Spikes auf der Oberfläche zu erzeugen.

Unter Pseudotypisierung versteht man den Einbau artfremder heterologer Hüllproteine in die Virushülle. Dabei entstehen virale Partikel mit dem Tropismus des Virus, von dem das heterologe Hüllprotein stammt (Zavada 1982). Solche chimären Virionen mit Komponenten verschiedener Viren werden als Pseudotypen bezeichnet (Abb.: 13). Die Pseudotypisierung ermöglicht die schnelle und effiziente Untersuchung spezifischer Eigenschaften der Virushüllproteine von Viren, die in ihren nativen Zuständen der höchsten Bio-Sicherheitsstufe 4 zugeordnet sind. Die retroviralen pseudotypisierten Viren sind nicht replikationsfähig und durchlaufen den retroviralen Replikationszyklus nur bis zur Integration.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete retrovirale System basierte auf MoMLV (Moloney Maus Leukämie Virus), dessen originale Hüllproteine von einem nur bei Mäuse- und Rattenzellen vorkommenden Rezeptor (Rec-1, einem Transporter für basische Aminosäuren) erkannt wird (Albritton, Tseng et al. 1989; Wang, Paul et al. 1991). Bei der Pseudotypisierung erfolgte der Austausch des für das MoMLV-Hüllprotein kodierenden Gens durch das Gen des LASV Glycoprotein-Vorläufers (Ab: 13). Des Weiteren wurde ein homologes pseudotypisiertes MoMLV erzeugt.

Zelllinie HEK-293T-Zellen

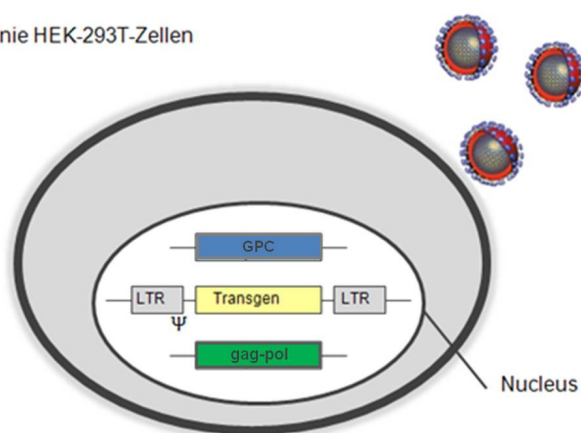


Abbildung 13: **Herstellung pseudotypisierter viraler Partikel über ein „drei-Plasmid-System“.** GPC kodiert das virale Hüllprotein; gag-pol kodiert die Strukturgene und die Polymerase; das Transgen kodiert den Selektionsmarker (eGFP); LTR steht für „long terminal repeat“ und beinhaltet einen starken Promotor, Enhancerelemente und Integrationssequenzen;  $\psi$  – Verpackungssignal; virale Partikel werden in den Zellkulturüberstand abgegeben und können mit dem Medium geerntet werden (Diplomarbeit Bianca Gielbert).

Zur Herstellung der Viren werden 293T Zellen mit drei verschiedenen Plasmiden transient transfiziert. Ein Plasmid enthält das Transfergen (GFP-green fluorescent protein) und das



---

Verpackungssignal ( $\psi$ ). Nach der Integration des Transgens in das Wirtsgenom ermöglicht die GFP Expression die Quantifizierung der viralen Partikel (Abb.: 13).

Ein weiteres Plasmid kodiert für die zur Verpackung des Virus nötigen Strukturproteine wie z.B. reverse Transkriptase und Integrase. Das dritte Plasmid enthält die Gene für das Hüllglykoprotein.

## 1.6. Projektbeschreibung und Zielsetzung

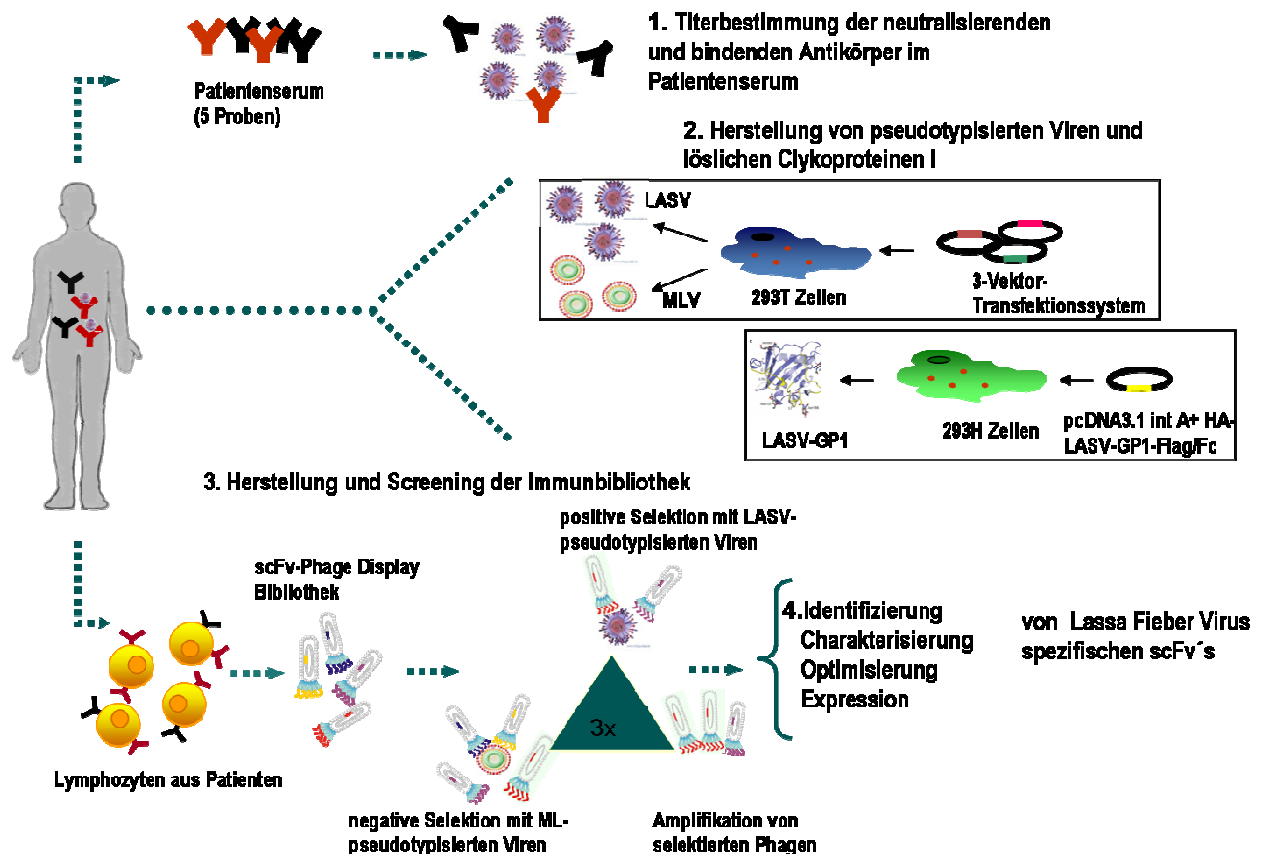


Abbildung 14: **Schematische Zusammenfassung des Projektes.** Oben: Die neutralisierenden bzw. bindenden Eigenschaften der Patientenserum wurden untersucht und charakterisiert. Mitte: Für die Biopanningexperimente wurden die pseudotypisierten LAS sowie ML Viren mit dem 3 Vektor Transfektionssystem hergestellt und an die verschiedenen Trägermoleküle immobilisiert. Zudem wurde ein lösliches Glykoprotein 1 in humanen Zellen exprimiert. Unten: Die aus dem Lymphozyten der LASV-Patienten isolierte RNA diente zur Amplifikation der Antikörper-Gene und zur Herstellung der Immunbibliothek, aus welcher anschließend LASV neutralisierende sowie bindende Antikörper isoliert wurden.

Gegenwärtig existieren weder eine Prophylaxe, eine spezifische Therapie noch ein Impfstoff gegen das LASV. Auch in Hinsicht auf die Diagnostik der viralen Erkrankung bzw. der Routineuntersuchungen bei der Organtransplantation sind keine kommerziell erhältlichen und gut etablierten Tests vorhanden.

Die protektive Wirkung Virus-neutralisierender Antikörper wurde sowohl in Tiermodellen als auch in infizierten Menschen mehrfach in unabhängigen Studien demonstriert. Dennoch ist über die Entstehung, Eigenschaften und Kinetik dieser Antikörper kaum etwas bekannt. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die humorale Antwort eines LASV-Patienten eingehend analysiert werden. Ausgangspunkt dieser Arbeit war ein, im Juli 2006, an hämorrhagischem Lassa-Fieber erkrankter Patient aus Sierra Leone. Der Patient wurde in der Goethe Universität Klinik in Frankfurt am Main hospitalisiert und erfolgreich mit Ribavirin therapiert. Während der nachfolgenden Untersuchungen im Zeitraum von 2006 bis 2010 wurden insgesamt fünf Blutproben entnommen.

---

Diese Proben sollten hinsichtlich der Bindungs- bzw. Neutralisationseigenschaften der Antikörper in verschiedenen Studien untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine scFv Phage Display Bibliothek aus dem Antikörperrepertoire des LASV-Patienten zu erstellen. Diese soll zur Isolierung der LASV-spezifischen Antikörperfragmente in einer Biopanningprozedur dienen. Parallel soll eine humane naive Bibliothek HAL 4/7 (Technische Universität Braunschweig, AG Prof. Dr. S. Dübel) analysiert werden. Als Selektionsgrundlage sollen zum einen die mithilfe der Pseudotypisierung hergestellten, retroviralen heterologen LASV Partikel und zum anderen lösliche in humanen Zellen exprimierte virale Glykoproteine eingesetzt werden. Da die Voraussetzung für eine erfolgreiche Selektion der spezifischen scFv die Immobilisierung der viralen Partikel an geeignete Trägermoleküle ist, werden im Laufe der Arbeit diverse Methoden entwickelt und getestet. Anschließend sollen die im Biopanning erzeugten Klone analysiert und ihre bindenden und neutralisierenden Eigenschaften charakterisiert werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Verbrauchsmaterialien und Lösungen

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, USA
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Tetracyclin	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Bacto-Trypton	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Yeast	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethanol 99,8%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Polyethylenglykol (PEG) 6000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
BSA Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen GmbH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Chloroquin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TMB Substratlösung für ELISA	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
Schwefelsäure für ELISA	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim

NBT Lösung	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
0,05% Trypsin/EDTA	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (PBS) ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>	PAA, Paschingen, Österreich
Ficol	PAA, Paschingen, Österreich
Streptavidin APC konj.	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin HRP konj.	Thermo Fisher Scientific, USA
Streptavidin	Jackson Immuno Research, USA
Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Scientific, USA
Penicillin / Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Quick-Load™ 100 bzw. 1000 bp DNA Ladder	New England BioLabs, Bad Soden, Deutschland

### 2.1.1. Lösungen und Medien

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Ampicillin-Lösung	100 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O; sterilfiltriert
Kanamycin-Lösung	25 mg/mL in Ethanol;
Chloramphenicol	75 mg/mL in Ethanol
Tetracyclin	30 mg/mL in Ethanol
DNA-Probenauftragspuffer (6x)	50% (v/v) Glycerin; 0,2% (v/v) SDS; 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol; 10 mM EDTA
Ethidiumbromidlösung	1% (w/v) in ddH <sub>2</sub> O gelöst
HEPES-Puffer (2x)	100 mM HEPES; 281 mM NaCl; 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,1
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	2,5 M CaCl <sub>2</sub> in ddH <sub>2</sub> O; sterilfiltriert
Magnesium-Lösung	1 M MgCl <sub>2</sub> , 1 M MgSO <sub>4</sub>
Saccharose-Lösung	20% Saccharose in 1000 mL PBS; sterilfiltriert
Glukose-Lösung	2M Glukose im 1000 mL ddH <sub>2</sub> O; sterilfiltriert
TAE-Puffer (50x)	Tris 1.220 g; Essigsäure 285.5 g; EDTA (0,5 M) 500 mL H <sub>2</sub> O in 5 l auf pH 8,0 einstellen
Glycin	0,2 M Glycin auf pH 2,2 eingestellt
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl mit 2 M NaOH auf pH 7,4 einstellen; autoklavieren (121 °C, 20min)
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar
2 x YT-Medium	16 g Bacto Tryptone; 10 g Bacto Yeast Extract; 5 g NaCl; 1000 mL H <sub>2</sub> O

2 x TY-Agar	1,5% (w/v) Agar-Agar in 2 x TY-Medium
2 x TY-GA-Medium	100 mM Glukose, 100 µg/mL Ampicillin in 2 x TY-Medium
2 x TY-AK-Medium	100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin
2 x TY-T-Medium	50 µg/mL Tetracyclin in 2 x TY-Medium
TB-Medium	12 g Bacto Trypton; 24 g Bacto Yeast Extract; 0.17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1000 mL H <sub>2</sub> O
SOC Medium	2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt; 0,05% (w/v) NaCl 20 mM Magnesium-Lösung, 20 mM Glukose, pH 7
Laemmli-Puffer	50% (v/v) Glycerin; 15% (v/v) β-Mercaptoethanol; 3,6% (w/v) SDS; 0,02% (w/v) Bromphenolblau
10% SDS	20 g SDS; 200 ml H <sub>2</sub> O
Sammelgel (4%)	13 ml Rotiphorese 30%; 25 ml 500 mM Tris, pH 6,8; 1 ml SDS 10%; 100 mL H <sub>2</sub> O
Trenngel (12%)	40 ml Rotiphorese 30%; 25 ml 1,5 M Tris, pH 8,8; 1 ml SDS (10%); 100 ml H <sub>2</sub> O
SDS-Laufpuffer 10x	30 g Tris; 144 g Glycin; 10 g SDS; ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Transferpuffer 10x	30 g Tris; 144 g Glycin; 1000 ml H <sub>2</sub> O
10x Probenpuffer (SDS Page)	5 ml Glycerin 100%; 1,5 mg SDS; 1,66 ml 3M Tris, pH 8,0 1 M DTT; 5 mg Bromphenolblau; 10 ml H <sub>2</sub> O
Kryo-Konservierungsmedium	10% DMSO in 10 mL FCS
FACS-Puffer	3% FCS in 100 mL PBS
MACS-Puffer	0,5% BSA in PBS; 2 mM EDTA; steril filtriert

### 2.1.2. Nährmedien und Zusatzstoffe für die Zellkultivierung

Medium/Zusatzstoff	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM	Invitrogen GmbH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Invitrogen GmbH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Panzerin 293 A	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

### 2.1.3. Vektoren und Plasmide

Name	Hergestellt von	Beschreibung
M5	AG von Laer, GSH	Expressionsplasmid mit CMV Promoter und VSV G Gen
M56a'	AG von Laer, GSH	Expressionsplasmid mit D2E GFP Gen (kürzere HWZ)
M108	AG von Laer, GSH	Expressionsplasmid mit CMV Promoter und LCMV GP (WE-HPI)
M118	AG von Laer, GSH	RRE-abhängiges Expressionsplasmid für HIV-1 env Stamm JRFL

M187	AG von Laer, GSH	Expressionsplasmid mit CMV Promoter und LCMV-GP
M188	AG von Laer, GSH	Expressionsplasmid mit CMV Promoter und LASV-GP (Josiah)
M288	AG von Laer, GSH	Klonierungsvektor mit CMV Promoter und MCS (PstI->KpnI)
M337	AG von Laer, GSH	Expressionsplasmid mit HIV GagPol
M420	AG von Laer, GSH	eGFP in einem lentiviralen SIN-Transfervektor
M579	AG von Laer, GSH	Expressionsplasmid mit MLV GagPol
H5N1-HA in M288	AG Dietrich, GSH	H5N1-HA kloniert in den Vektor M288
GPC-LASV AV in M288	AG Dietrich, GSH	Lassa AV GPC kloniert in den Vektor M288
GPC-LASV CSF in M288	AG Dietrich, GSH	Lassa CSF GPC kloniert in den Vektor M288
GPC-LASV NL in M288	AG Dietrich, GSH	Lassa NL GPC kloniert in den Vektor M288
Z-LASV NL in M288	AG Dietrich, GSH	Lassa NL Z Protein kloniert in den Vektor M288
pCR-BluntII TOPO	Invitrogen GmbH	Plasmid Vector mit linealisierten <i>Vaccinia</i> virus DNA Topoisomerase I
pHAL 14	AG Dübel, TU Braunschweig	Phagen-Display Vektor für die Präsentation von scFv als scFv::pIII Fusionsprotein auf M13-Phagen und die Expression unfusionierter scFv

### 2.1.4. Primer

Name	Richtung	Sequenz 5' → 3' (rot: Enzymschnittstelle)
lacZ	forward	ggc tcg tat gtt gtg tgg
M13-96 pIII	revers	ccc tca tag tta gcg taa cg
MHVH1_f	forward	cag gtb cag ctg gtg cag tct gg
MHVH1/7_f	forward	car rts cag ctg gtr car tct gg
MHVH2_f	forward	cag rtc acc ttg aag gag tct gg
MHVH3_f1	forward	sar gtg cag ctg gtg gag tct gg
MHVH3_f2	forward	gag gtg cag ctg ktg gag wcy sg
MHVH4_f1	forward	cag gtg car ctg cag gag tcg gg
MHVH4_f2	forward	cag stg cag ctr cag sag tss gg
MHVH5_f	forward	gar gtg cag ctg gtg cag tct gg
MHVH6_f	forward	cag gta cag ctg cag cag tca gg
MHIgGCH1_r	revers	gac cga tgg gcc ctt ggt gga
MHVK1_f1	forward	gac atc cag atg acc cag tct cc
MHVK1_f2	forward	gmc atc crg wtg acc cag tct cc

MHVK3_f	forward	gaa atw gtg wtg acr cag tct cc
MHVK4_f	forward	gac atc gtg atg acc cag tct cc
MHkappaCL_r	revers	aca ctc tcc cct gtt gaa gct ctt
MHVL1_f1	forward	cag tct gtg ctg act cag cca cc
MHVL1_f2	forward	cag tct gtg ytg acg cag ccg cc
MHVL2_f	forward	cag tct gcc ctg act cag cct
MHVL3_f1	forward	tcc tat gwg ctg acw cag cca cc
MHVL3_f2	forward	tct tct gag ctg act cag gac cc
MHVL4_f1	forward	ctg cct gtg ctg act cag ccc
MHVL4_f2	forward	cag cyt gtg ctg act caa tcr yc
MHVL5_f	forward	cag sct gtg ctg act cag cc
MHVL6_f	forward	aat ttt atg ctg act cag ccc ca
MHVL7/8_f	forward	cag rct gtg gtg acy cag gag cc
MHVL9/10_f	forward	cag scw gkg ctg act cag cca cc
MHlambdaCL_r	revers	tga aca ttc tgt agg ggc cac tg
MHlambdaCL_r2	revers	tga aca ttc cgt agg ggc aac tg
MHVH1-Ncol_f	forward	gtc ctc gca <b>cc atg gcc</b> cag gtb cag ctg gtg cag tct gg
MHVH1/7-Ncol_f	forward	gtc ctc gca <b>cc atg gcc</b> car rts cag ctg gtr car tct gg
MHVH2-Ncol_f	forward	gtc ctc gca <b>cc atg gcc</b> cag rtc acc ttg aag gag tct gg
MHVH3-Ncol_f	forward	gtc ctc gca <b>cc atg gcc</b> sar gtg cag ctg gtg gag tct gg 3'
MHVH3-Ncol_f2	forward	gtc ctc gca <b>cc atg gcc</b> gag gtg cag ctg ktg gag wcy sg
MHVH4-Ncol_f1	forward	gtc ctc gca <b>cc atg gcc</b> cag gtg car ctg cag gag tgg gg
MHVH4-Ncol_f2	forward	gtc ctc gca <b>cc atg gcc</b> cag stg cag ctr cag sag tss gg
MHVH5-Ncol_f	forward	gtc ctc gca <b>cc atg gcc</b> gar gtg cag ctg gtg cag tct gg
MHVH6-Ncol_f	forward	gtc ctc gca <b>cc atg gcc</b> cag gta cag ctg cag cag tca gg
MHIgGCH1scFv-HindIII_r	revers	gtc ctc gca <b>aag ctt</b> gac cga tgg gcc ctt ggt gga
MHVK1scFv-MLuI_f1	forward	acc gcc tcc <b>a cgc gta</b> gac atc cag atg acc cag tct cc
MHVK1scFv-MLuI_f2	forward	acc gcc tcc <b>a cgc gta</b> gmc atc crg wtg acc cag tct cc
MHVK3scFv-MLuI_f	forward	acc gcc tcc <b>a cgc gta</b> gaa atw gtg wtg acr cag tct cc
MHVK4scFv-MLuI_f	forward	acc gcc tcc <b>a cgc gta</b> gac atc gtg atg acc cag tct cc
MHVK5scFv-MLuI_f	forward	acc gcc tcc <b>a cgc gta</b> gaa acg aca ctc acg cag tct cc
MHVK6scFv-MLuI_f	forward	acc gcc tcc <b>a cgc gta</b> gaw rtt gtg mtg acw cag tct cc
MHkappaCLscFv-NotI_r	revers	acc gcc tcc <b>gc ggc cgc</b> gaa gac aga tgg tgc agc cac agt
MHVL1-MLuI_f1	forward	acc gcc tcc <b>a cgc gta</b> cag tct gtg ctg act cag cca cc
MHVL1-MLuI_f2	forward	acc gcc tcc <b>a cgc gta</b> cag tct gtg ytg acg cag ccg cc



MHVL2-MLuI_f	forward	acc gcc tcc a cgc gta cag tct gcc ctg act cag cct
MHVL3-MLuI_f1	forward	acc gcc tcc a cgc gta tcc tat gwg ctg acw cag cca cc
MHVL3-MLuI_f2	forward	acc gcc tcc a cgc gta tct tct gag ctg act cag gac cc
MHVL4-MLuI_f1	forward	acc gcc tcc a cgc gta ctg cct gtg ctg act cag ccc
MHVL4-MLuI_f2	forward	acc gcc tcc a cgc gta cag cyt gtg ctg act caa tcr yc
MHVL5-MLuI_f	forward	acc gcc tcc a cgc gta cag sct gtg ctg act cag cc
MHVL6-MLuI_f	forward	acc gcc tcc a cgc gta aat ttt atg ctg act cag ccc ca
MHVL7/8-MLuI_f: 5' 3'	forward	acc gcc tcc a cgc gta cag rct gtg gtg acy cag gag cc
MHVL9/10-MLuI_f	forward	acc gcc tcc a cgc gta cag scw gkg ctg act cag cca cc
MHLambdaCLscFv-NotI_r	reverse	acc gcc tcc gc ggc cgc aga gga sgg ygg gaa cag agt gac
Lassa AV GPC XhoI	forward	acg ctc gag gcc atg ggg caa ata gtg aca tct
Lassa AV GPC BamHI	reverse	gga tcc cta tct ctt cca tct cac ggg gac gcc
Lassa CSF GPC XhoI	forward	acg ctc gag gcc atg ggt cag ata gtg aca ttc
Lassa CSF GPC BamHI	reverse	gga tcc tta tct ctt cca cct cac aga tcc cac
Lassa NL GPC XhoI	forward	acg ctc gag gcc atg gga caa ata gtc aca ttc
Lassa NL GPC BamHI	reverse	cga tcc tca cct ctt cca ttt tac agg cac acc
Lassa NL Z XhoI	forward	att ctc gag gcc atg gga aac aag gaa acc aaa gcc
Lassa NL Z BamHI	reverse	aag gga tcc tca ggg act gta gta ggg tgg agg tct
GAPDH. 5P1	forward	ccg cgg ggc tct cca gaa cat ca
GAPDH. 3P1	reverse	cga cgc ctg ctt cac cac ctt ctt

<u>M</u>	<u>R</u>	<u>W</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>D</u>	<u>B</u>	<u>N</u>
AC	aG	AT	GC	CT	GT	AGC	ACT	AGT	GCT	AGCT

### 2.1.5. Enzyme

Enzym	Hersteller
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim, Deutschland
Alkalische Phosphatase	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Restriktionsendonukleasen: Eco RI; Bam HI; Hind III, Nco I, Xho I,	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Red Taq-Polymerase	Sigma, München, Deutschland
Green Taq-Polymerase	Fermentas, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Fermentas, Deutschland
DNase	Qiagen, Hildesheim, Deutschland
Rnase OUT	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland

### 2.1.6. Kit-Systeme

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
CaPhos Transfektionskit	Sigma, München, Deutschland
QiAmp RNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hildesheim, Deutschland
RT Super Script III	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen, Hildesheim, Deutschland
Plasmid Maxi Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München, Deutschland
Nukleo Spin Extract II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay	Promega, Madison, USA
Detoxi Gel Endotoxin Removing Columns	Thermo Scientific, Deutschland
MACS LD Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

### 2.1.7. Antikörperbibliotheken

<b>Bibliothek</b>	<b>Titer</b>	<b>Hergestellt von</b>
HAL 4 und 7	5x10 <sup>9</sup> Klone	Hergestellt im AK Dübel, TU Braunschweig aus dem Blut eines naiven Spenders
LASV Bib.	2x10 <sup>7</sup> Klone	Hergestellt im AK Dietrich, GSH aus dem Blut eines LASV-Patienten

### 2.1.8. Antikörper und Seren

<b>Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>
HRP-konj. Maus $\alpha$ -M13 mAK	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
HRP-konj. Ziege $\alpha$ -Human IgG (H+L)	Dianova, Hamburg, Deutschland
HRP-konj. Ziege $\alpha$ -Maus IgG (H+L)	Dianova, Hamburg, Deutschland
HRP-konj. Ziege $\alpha$ -Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland
HRP-konj. Ratte $\alpha$ -Ziege IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland
PE-konj. Ziege $\alpha$ -Human	Dianova, Hamburg, Deutschland
PE-konj. Mause $\alpha$ -Human CD20	BD, Heidelberg, Deutschland
PE-Cy5.5 konj. Mause $\alpha$ -Human CD34	Invitroge, Karlsruhe, Deutschland
HRP konj. Maus $\alpha$ -c-myc	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Maus $\alpha$ -c-myc	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Kaninchen $\alpha$ -HA, polyklon.	ProSci, Poway, USA
Kaninchen $\alpha$ -HA, polyklon.	Dianova, Hamburg, Deutschland
Kaninchen $\alpha$ -Flag, polyklon	ThermoScientific, Deutschland
Kaninchen $\alpha$ -Lysozym, polyklon	Antibodies online, Deutschland
HRP-konj. Ziege $\alpha$ -IgG ( $\gamma$ -chain)	Sigma, München, Deutschland
Maus $\alpha$ -pIII	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Lassa Fieber Patienten Serum I-V	Goether Universitätsklinik, Deutschland
Anti-MLV polyklonales Serum	Dr. B. Schnierle, PEI, Deutschland

### 2.1.9. Bakterien und Bakteriophagen

<b>Stamm</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>E.coli</i> -TOP10	mcrA, $\Delta$ (mcrBC-hsdRMS-mrr), end A1, recA1, relA1, gyrA96, $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15, deoR, nupG, araD139, F(lacIq, Tn10(Tetr)), galU, $\Delta$ lacX74, galK, $\Delta$ (ara-leu)769	Invitrogen GmbH, Deutschland
DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ -	Invitrogen GmbH, Deutschland
<i>E. coli</i> XL-1 Blue MRF'	K12-Stamm zur Expression von scFv und Infektion durch M13-Phagen; $\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
M13KO7	M13KO7 ist ein Derivat des M13 Phage, trägt eine mutation Met40Ile in gII und Kanamycin-Resistenz	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Hyperphage M13KO7 $\Delta$ pIII	Trägt eine Deletion in pIII Gen	Progen Biothechnik, Heidelberg, Deutschland

### 2.1.10. Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft und ATCC-Katalognummer</b>	<b>Kondition</b>	<b>Medium</b>
HEK 293T	Humane embryonale Nieren-Epithelzellen mit dem inserierten T-Antigen von SV40 (Simianes Virus 40). T Antigen ist das bedeutendste regulatorische Protein des SV40 Virus; <b>CRL-11268</b>	adhärent	DMEM-Standard 10% FCS 1% Penicillin 1% L-Glutamin
HEK 293T LASV-GPC	293T Zellen stabil transfiziert mit LASV Glycoprotein-Precursor und Puromycin-Resistenz	adhärent	DMEM-Standard 10% FCS 1% Penicillin 1% L-Glutamin
HEK 293H	Humane embryonale Nieren-Epithelzellen, transformiert mit Adenovirus 5 DNA; <b>CRL-1573</b>	adhärent im serumfreien Medium	293 A
PM-1	humane T-Zelllinie, exprimieren CD4, CXCR4, CCR5	suspension	RPMI-Standard 10% FCS 1% Penicillin 1% L-Glutamin
T 671	Humane rhabdomyosarcoma Zelllinie	adhärent	DMEM-Standard 10% FCS 1% Penicillin 1% L-Glutamin
HuH7	Human hepatocarcinoma Zelllinie	adhärent	DMEM-Standard 10% FCS 1% Penicillin 1% L-Glutamin
L929	Murine Fibroblasten; <b>CCL-1</b>	adhärent	DMEM-Standard 10% FCS 1% Penicillin 1% L-Glutamin
HeLa	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms; <b>CCL-2</b>	adhärent	DMEM-Standard 10% FCS

			1% Penicillin 1% L-Glutamin
A545	Aves Lungen- Epithelzellen	adhärent	DMEM-Standard 10% FCS 1% Penicillin 1% L-Glutamin

### 2.1.11. Einwegmaterial

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Reaktionsgefäße 250 mL	Corning, New York, USA
Reaktionsgefäße 15 mL, 50 mL	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,2 mL, 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filterspitzen Biosphere 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Greiner bio-one, Frickhausen, Deutschland
48-, 24-Wells-Kulturplatten	Corning, New York, USA
Kulturschalen Ø10 cm	Greiner bio-one, Frickhausen, Deutschland
Kulturflächen 125, 250, 750 mL	Greiner bio-one, Frickhausen, Deutschland
Kryo-Röhrchen 1,5 mL	Greiner bio-one, Frickhausen, Deutschland
Spritzenaufsatzfilter Millex-HA 0,25 µL bzw. 0,45 µm	Millipore, Schwalbach, Deutschland
ELISA 96-Wells-Platten	Greiner Bio-One, Nunc; Deutschland
ELISA 96-Wells-Platten,	Greiner Bio-One, Nunc; Deutschland
Plattenabdichter	Dunn Labortechnik, Aasbach, Deutschland
Plattenabdichter „Area Seal“	Dunn Labortechnik, Aasbach, Deutschland
Einwegspritze 5-, 10-, 20 mL	Codan, Lensahn, Deutschland
Sterile Einwegpipetten 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Ultrazentrifugenröhrchen Polyallomer 25 x 89 mm	Beckman, Krefeld, Deutschland
Rundbodenröhrchen, 5 mL (Polystyrol, FACS Röhrchen)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
250-500 mL Vakuumfiltereinheit (0,22 µm und 0,45 µm Porengröße)	Corning, New York, USA
SLIDE-A-LYZER® DIALYSE Kassette 100-200 µl, 0,5-3 mL	AbD Serotec, North Carolin, USA
Nitrozellulosemembran Optitran BA-S 83	Merck, Darmstadt, Deutschland
Skalpelle	Swann-Morton, Sheffield, England
Streptavidin-gekoppelte Dynabeads M280	Invitrogen GmbH GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Dynalbeads M-450, tosylaktiviert	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ApoH Beads, beschichtet mit Apolipoprotein H	ApoH Technologies, La Grande Motte, Frankreich
Beads, anionische beschichtet mit Poly (Methyl-Vinyl-Ether Maleinsäureanhydrid)	Viro-Ademtech Beads, Pessac, Frankreich

### 2.1.12. Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
ABIPRISM 3100-Avant	Applied Biosystems, HITACHI, Foster City, USA
Analysewaage 420-42	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Autoclav 2540 EL	Tuttnauer, Tel Aviv, Israel
Brutschrank FunktionLine	Heraeus, Hanau, Deutschland
Casy TT, Zellzählsystem	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
DNA Elektrophorese Apparatur	Bio-Rad, München, Deutschland
Durchflussszytometer FACS-Calibur	BD, Heidelberg, Deutschland
ELISA Reader SpectraMax 340	Molecular Devices Corp., Sunnyvale CA, USA
BioRad Elektroporator Gene Pulser Mxcell	Bio-Rad, München, Deutschland
Gel-Doc Imaging System	Bio-Rad, München, Deutschland
FACS Calibur, FACSScan, FACS Canto	BD, Heidelberg, Deutschland
Heizblock Dri-Block DB2D	Techne, Duxford, England
Kühl-/Gefrierschränke Glass Line	Liebherr Holding GmbH, Biberach, Deutschland
Kühlzentrifuge Ronanta 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Lumistar Optima	BMG LABTECH GmbH, Offenburg
Magnetrührer KM02	Janke und Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland
Mikroskop DM E, Binokular	Leica, Bensheim, Deutschland
Minifuge Mikro220	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Nano Drop	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
pH-Meter HI 9321	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Tube Rotator	Kisker, Steinfurt, Deutschland
SmartSpec Plus Spectrophometer	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttelinkubator TH25, TH30	Johanna Otto GmbH, Hechingen, Deutschland
Spannungsquelle Power Pac 1000	Bio-Rad, München, Deutschland
Sterilbank Kojair, 2009	Bio-Flow Technik, Meckenheim, Deutschland

Sterilbank Biosafe 1.2	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
T3 Thermocycler	Whatman BiometraR, Göttingen, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry	Bio-Rad, München, Deutschland
ThermoShaker PST-HL-4	Glasatelier-saillart, Meerhout, Belgium
UV-Transilluminator GelDoc 2000	Bio-Rad, München, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender und Hobein, Zürich, Schweiz
Ultrazentrifugenrotor SW32-Ti	Beckman, Krefeld, Deutschland
Ultrazentrifuge L8M	Beckman, Krefeld, Deutschland
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Großwedel

### ***2.1.13. Wissenschaftliche Programme und Datenbanken***

<b><i>Programm</i></b>	<b><i>Datenbank</i></b>
Blast Align	IMG
ClustalW	NCBI
Grafit 7	NetNGly
LaserGene	VBASE 2

---

## **2.2. Mikrobiologische Methoden**

### **2.2.1. Kultivierung und Lagerung von *E. coli***

Die Kultivierung von Bakterien erfolgt bei 37°C je nach Versuchsziel in verschiedenen Nährmedien, welche in Kapitel 2.1.2 aufgelistet sind. Zur Selektion der transformierten Bakterien wird zu den Medien bzw. den Agarplatten in Abhängigkeit zur jeweiligen eingefügten Resistenz ein Antibiotikum zugesetzt.

Kurzfristig können die Bakterienkolonien auf Agarplatten oder in Flüssigkulturen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden, wobei die Bakterien ihre Teilungsfähigkeit über einige Wochen erhalten. Zu einer dauerhaften Lagerung wird dem Kulturvolumen die gleiche Menge an einer 50%igen Glycerin-PBS- oder einer 7%igen DMSO-PBS-Lösung beigemischt. Dieses Gemisch wird in ein Kryo-Röhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

### **2.2.2. Herstellung chemisch kompetenter Zellen**

Chemisch kompetente Bakterien sind in der Lage genetisches Material aus ihrem Umfeld aufzunehmen. Zur Erzeugung der chemischen Kompetenz werden die Bakterien mit einer Calciumchlorid-Lösung behandelt. Dabei verändern die Calcium-Ionen die Permeabilität sowie die Ladung der Membran und steigern die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Fremd-DNA.

Für die Herstellung solcher Zellen werden die Bakterien vereinzelt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Einzelne Klone werden von der Platte gepickt, mit 4 mL LB-Medium versetzt und bei 37°C über Nacht wachsen gelassen. 1 mL dieser Kultur wird zum Animpfen von 400 mL LB Medium verwendet. Nach dem Erreichen eines OD-Wertes zwischen 0,4 und 0,6 (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm) wird die Suspension auf Eis gekühlt. Im nächsten Schritt werden die Zellen bei 10000 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 ml eiskaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach dem nächsten Sedimentationsschritt bei 10000 g (10 min) wird das Pellet erneut mit 20 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>/15% (v/v) Glycerin resuspendiert und bei 4°C vier Stunden inkubiert. Anschließend werden die Bakterien à 200µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.2.3. Transformation von *E. coli***

Unter Transformation versteht man eine nicht-virale Aufnahme genetischen Materials in eine Zelle. Es gibt zwei Wege, um freie DNA oder ein Plasmid, in die Bakterien einzubringen. Bei der ersten und einfacheren Methode handelt es sich um einen Hitzeschock. Hierfür werden chemisch kompetente Bakterien verwendet. 50 µl Bakterien werden auf Eis aufgetaut, dann mit der DNA eines Ligationsansatzes (10-50 µl) oder mit *supercoiled* Plasmid-DNA (10 ng) versetzt und 20 min bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C (90 bis 120 s). Durch die dabei entstehenden Poren in der Membran können DNA-Moleküle in die Zellen gelangen.

Danach folgt eine Abkühlung des Ansatzes für 5 min auf Eis. Anschließend werden die Bakterien in 200 µL LB-Medium aufgenommen und 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Letztlich werden die Zellen auf einer Antibiotikum-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Am nächsten Tag werden 2 mL LB-Medium mit einzeln ausgewählten Klonen angeimpft. Nach 4-6 Stunden werden die Zellen in einer Plasmid-Minipräparation aufgeschlossen, die Plasmid-DNA isoliert und analysiert.

Eine weitere Methode ist die so genannte Elektroporation. Hierfür werden die Bakterien mit einem elektrischen Schock behandelt (2000-2500 V für 4,3-4,9 Millisekunden), um deren Membran zu öffnen. Dieses Verfahren erweist sich als effektiver im Vergleich zu der chemischen Methode, da die Transformationseffizienz (die Transformationseffizienz ist ein Maß für die Kompetenz der Zellen und gibt an, wie viele Transformanten bei einem Transformationsexperiment mit 1 µg eines superhelikalen, ringförmigen Plasmids erzielt werden können) bei der Elektroporation mit  $10^{10}$  Klonen bis zu zwei *log*-Stufen größer ist als bei der Hitzeschock-Methode, bei welcher nur bis zu  $10^8$  transformierte Klone erzielt werden können.

Für die Elektroporation werden 25 µL der elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit Ligationsansatz bzw. Plasmid gemischt. Das Gemisch wird in eine 0,1 cm vorgekühlte Küvette überführt. Die Küvette wird in einen Elektroporator gestellt, wobei die Elektroden abgetrocknet werden sollen. Sofort nach einem kurzen (4,3-4,6 ms) 1,7 kV starken Puls wird 1 ml auf 37°C vorgewärmtes SOC Medium hinein gegeben. Die Suspension wird in ein Reaktionsgefäß überführt und eine Stunde bei 37°C und 600 rpm geschüttelt. Danach werden 990 µL Suspension entnommen, auf eine große SOB-GA Platte (als Pizza-Platten bezeichnet) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die restlichen 10 µL werden für die Bestimmung der Transformationseffizienz verwendet. Der Titer der Transformanten soll im Bereich von  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^8$  der Plasmid-haltigen Klone liegen. Zur Kontrolle der Transformation werden einzelne Bakterien-Kolonien in einer PCR analysiert. Anschließend wird der gesamte Bakterienrasen mit einem Drigalskispatel in 40 ml SOB Medium abgeschwemmt und die Suspension für eine weitere Plasmid-Präparation verwendet.

#### **2.2.4. Selektion von scFv-präsentierenden Phagen aus Antikörperbibliotheken**

Für die negative Prä-Selektion der scFv-Fragmente aus einer Phagen-Bibliothek werden Antigene (Viren und Proteine) direkt oder über eine Biotin/Streptavidin Bindung auf einer Mikrotiterplatte bzw. an den magnetischen Beads immobilisiert (Kap. 2.6.1). Je nach Ansatz werden zu dem gebundenen Antigen  $1 \times 10^{10}$  Phagen von der Immunbibliothek ( $\lambda$  und  $\kappa$  in gleichen Anteilen) oder  $5 \times 10^{11}$  Phagen von der naiven Bibliothek HAL4/7 ( $\lambda$  und  $\kappa$  in gleichen Anteilen) zugegeben und für zwei bis drei Stunden bei RT unter ständigem Schütteln bzw. Rotieren inkubiert. Danach wird der Überstand entnommen und zum positiven immobilisierten



Antigen überführt. Die Inkubation erfolgt für zwei bis drei Stunden bzw. über Nacht. Anschließend wird der Überstand entfernt, die Mikrotiterplatten-Vertiefungen bzw. Beads werden 30-fach schonend mit PBS gewaschen, bevor die gebundenen Phagen mithilfe von 200 µL der Trypsin/EDTA Lösung für 30 min bei 37°C eluiert werden. Daraufhin werden Bakterien mit eluierten Phagen infiziert (Kap. 2.3.5.). Die zweite und dritte Runde verlaufen nach dem gleichen Schema, wobei die Anzahl der eingesetzten Phagen auf  $1 \times 10^9$  für die Immun- und  $1 \times 10^{10}$  für die naive Bibliothek reduziert wird. Auch die Anzahl der Waschschrte soll bei der dritten Runde auf das 40 -fache erhöht werden, um die Spezifität der gebundenen Phagen zu steigern.

### **2.2.5. Infektion von Bakterien mit eluierten Phagen**

Die Phagen werden in einem Volumen von 200 µl eluiert, davon werden 190 µL für die Amplifikation und 10 µL für eine Titerbestimmung eingesetzt. Einen Tag vor der Amplifikation wird eine Phagenwirtskultur XL-1 Blue MRF' in einem mit Tetracyclin (30 µg/mL Endkonzentration) versetzten 2YT Medium angesetzt. Am Tag der positiven Selektion wird eine frische Bakteriensuspension vorbereitet, indem 50 ml frisches 2YT Medium mit der Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 versetzt werden. Das Wachstum erfolgt bei 37°C und ständigem Schütteln bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,4-0,5. 20 ml angewachsener Bakterien werden entnommen und mit 190 µL eluierten Phagen infiziert. Die Infektion erfolgt bei 37°C ohne Schütteln gefolgt von einer Inkubation unter Schütteln für 30 min bei 250 rpm. Danach werden die Bakterien pelletiert, in dem verbleibenden Tropfen Medium nach Abschütten des Überstandes resuspendiert, auf eine große ( $d = 15$  cm)  $2YT_{Amp/Glukose}$  Platte ausgestrichen und anschließend über Nacht inkubiert.

### **2.2.6. Phagenproduktion: Verpacken mit Helferphagen**

Für die Phagenproduktion wird der Bakterienrasen in 40 ml  $2YT_{Amp/Glukose}$  Medium mit einem Drigalskispatel von der Platte vorsichtig abgelöst. Bei der Bibliothekherstellung wird statt  $2YT_{Amp/Glukose}$  SOB Medium verwendet. Von der Bakteriensuspension wird je 1 ml in Kryoröhrchen überführt, 250 µl Glycerin werden hinzugefügt und der Ansatz bei -80°C eingefroren. 400 ml  $2YT_{Amp/Glykose}$  werden mit 1 ml Glycerolstock oder 1 ml frischer Bakteriensuspension (Start  $OD_{600} < 0,1$ ) angeimpft. Das Wachstum erfolgt im Schüttelinkubator bei 250 rpm und 37°C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4-0,5. Daraufhin werden 25 ml Bakterien ( $\sim 1,25 \times 10^{10}$  Bakterien) in ein Falconröhrchen überführt, mit Helferphagen (M13K07) im Verhältnis 1 zu 20 ( $2,5 \times 10^{11}$  pfu) infiziert, anschließend für 30 min bei 37 °C in Ruhe und darauf 30 min bei 250 rpm unter Schütteln inkubiert. Um die Glucose zu entfernen, welche die Phagenbildung hemmen würde, werden die Bakterien bei 3600 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird vorsichtig im restlichen 2TY Medium resuspendiert und in 400 ml  $2YT_{Amp/Kan}$  aufgenommen. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 250 rpm und 30°C im Schüttelinkubator. Am nächsten Tag werden die Bakterien für 10 min bei 7700 g und 4°C pelletiert. Der Überstand wird

in zwei neue Röhrchen überführt. Die Phagenpartikel werden durch die Zugabe von 1/5 Volumenanteilen PEG/NaCl gefällt. Hierfür wird der Überstand gut durchgemischt und für 1 h auf einer Wippe auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation erfolgt für eine Stunde bei 7700 g und 4°C. Das Pellet wird in 10 ml Phage Dilution Buffer resuspendiert und mit 1/5 Volumenanteilen PEG/NaCl versetzt. Nach dem Mischen wird der Ansatz erneut auf einer Wippe auf Eis für 20 min inkubiert. Im nächsten Schritt werden die Phagen durch Zentrifugation für 30 min bei 9150 g und 4°C pelletiert. Die PEG-Lösung soll gründlich entfernt werden. Das Pellet wird in 1 ml Phage Dilution Buffer aufgenommen und die Bakterienreste durch Zentrifugation (1 min bei 13.000 g) sedimentiert. Letztlich wird der Überstand über einen 0,45 µm Filter in ein 2 mL Röhrchen filtriert, um alle Bakterienreste zu entfernen. Anschließend soll der Titer der produzierten Phagen ermittelt werden.

### 2.2.7. Titerbestimmung der Phagen

Einen Tag vor der Titerbestimmung werden 5 ml 2YT<sub>Tet</sub> mit XL1-Blue MRF' angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden 50 ml 2YT<sub>Tet</sub> Medium in einem Erlenmeyerkolben mit 500 µl Übernachtskultur versetzt. Das Wachstum erfolgt im Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,5 (~5·10<sup>8</sup> Bakterien/ml). Jeweils 1 ml einer 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup> und 10<sup>-10</sup> Verdünnung von der Phagenlösung werden in PBS-Puffer hergestellt (Tab. 2).

Tabelle 2: Herstellung einer Phagen-Verdünnungsreihe

	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup> Verdünnung	10 <sup>-6</sup> Verdünnung	10 <sup>-8</sup> Verdünnung	10 <sup>-10</sup> Verdünnung
PPS-Puffer (µL)	990	900	990	990	990
Phagen (µL)	10	100 von 10 <sup>-3</sup> Lösung	10 von 10 <sup>-4</sup> Lösung	10 von 10 <sup>-6</sup> Lösung	10 von 10 <sup>-8</sup> Lösung

10 µl Phagenlösung (dies bedeutet eine weitere 1:100 Verdünnung und entsprechend eine Verdünnungsreihe: 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-10</sup> und 10<sup>-12</sup>) werden zu jeweils 50 µl XL1-Blue in einem Eppendorfgefäß gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die mit den Phagen infizierten Bakterien werden auf 2YT<sub>Amp/Glukose</sub> Agar ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Da die Bakterien mit den aufgenommenen Phagemiden langsamer wachsen als die ohne, werden die Kolonien erst 24 Stunden nach der Aussat ausgezählt. Der korrespondierende Phagentiter cfu/ml (Koloniebildende Einheit oder *Colony Forming Unit*) wird durch Auszählen der gewachsenen Kolonien (cfu) und unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe der Phagensuspension (mL) berechnet.

### 2.2.8. Produktion von löslichen scFv-Fragmenten

Nach der dritten Runde werden die Bakterien-Kolonien nicht von der Platte abgeschwemmt, sondern einzelne Klone zur Herstellung einer Masterplatte verwendet. Hierfür werden 92 Klone

von der Agarplatte gepickt und in einer 96 Well-Zellkulturplatte mit 200 µl 2YT<sub>Amp/Glukose</sub>/ Well über Nacht unter Schütteln bei 750 rpm und 37°C angezüchtet. Zusätzlich soll das Medium in zwei weiteren Vertiefungen mit einem Klon angeimpft werden, dessen Phagemid das spezifische scFv-Antikörperfragment D1.3 für murines Hühnereiweiß-Lysozym kodiert. Die von diesen Bakterien prozessierten scFv-Fragmente werden als Kontrolle verwendet. Am nächsten Tag werden zu den Vertiefungen 100 µl 50% Glycerin/PBS pro Well hinzugefügt und die Masterplatte wird bei -80°C eingefroren

Für die Produktion von löslichen Antikörperfragmenten werden in die Vertiefungen einer ELISA-Platte aus Polypropylen 180 µL 2YT<sub>Amp/Glukose</sub> vorgelegt und mit einzelnen Klonen aus der Masterplatte angeimpft, wobei zu beachten ist, dass die Übertragung eins zu eins erfolgen soll, damit die jeweiligen Masterklone später analysiert werden können. Die Klone werden bei 37°C und unter Schütteln bei 750 rpm über Nacht inkubiert. Am Tag darauf werden 20 µL von den jeweiligen Klonen in eine neue ELISA-Platte überführt (180 µL 2YT<sub>Amp/Glukose</sub> Medium/Well) und zwei Stunden bei 37°C und 750 rpm angezogen. Die Platte soll dabei einen U- bzw. V-formigen Boden haben, um das spätere Absaugen von Medium zu erleichtern. Dies erfolgt nach einer Zentrifugation bei 3000 g für 20 min und hat zum Zweck, die Glukose aus dem Medium zu entfernen, um die Produktion von löslichen scFv-Fragmenten zu stimulieren. Danach werden in die Vertiefungen 180 µL 2YT<sub>Amp/IPTG</sub> hinzugefügt und die Bakterien über Nacht unter Schütteln bei 30°C und 1200 rpm inkubiert. Die Inkubation bei einer hohen Drehzahl soll die Freisetzung von scFv-Fragmenten aus dem Periplasma in das Medium gewährleisten. Am darauf folgenden Tag werden die Klone erneut zentrifugiert, die scFv-haltigen Überstände werden in eine neue ELISA-Platte eins zu eins überführt und mit 50 µL 5% BSA in PBS versetzt. Die Überstände werden im ELISA-Test einzeln auf ihre bindenden Eigenschaften analysiert.

### ***2.2.9. Aufreinigung von scFv-Überständen mittels Detoxi Gel Endotoxin Removing Säulen***

Um die scFv-haltigen bakteriellen Überstände für die Zellkultur-Arbeiten (Neutralisationstests) verwenden zu können, werden diese über einen Filter mit der Porengröße von 0,1 µm aufgereinigt und auf die Detoxi Gel Endotoxin Removing Säulen (enthalten Antibiotikum Polymixin B) gegeben. Die Säulen werden zuvor durch 5-faches Waschen mit 1% Natriumdeoxycholat aktiviert. Die Säuleäquilibration wird durch Waschen mit destilliertem Wasser gewährleistet (5 mL). Der Durchfluss erfolgt allein angetrieben durch die Schwerkraft. Daher sollen die Proben für einen besseren Durchfluss auf dem Resin-Bett in der Säule ca. eine Stunde inkubiert werden. Anschließend wird auf die Säule 1 ml Wasser zugegeben, um den Vorgang zu beschleunigen. Nach dem Durchlauf werden ca. 90% der Probe gesammelt. Diese werden im Weiteren für die Neutralisationstests mit den Säugerzellen verwendet.

## **2.3. Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1. Plasmidpräparation und photometrische DNA-Quantifizierung**

Die Plasmidpräparation dient zur Isolierung der extrachromosomalen Plasmid-DNA und erfolgt je nach Bedarf mithilfe verschiedener Kit-Systeme. Für die analytische Plasmidpräparation (Mini-Präp) werden einzelne Kolonien in 5ml Antibiotikum-haltigen (entsprechend der jeweiligen Resistenz) LB-Medium inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Für die große Plasmidpräparation (Maxi-Präp) werden 250 ml LB oder TB Medium mit einem jeweiligen Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Die Isolierung der DNA erfolgt nach der Anleitung des Herstellers über die Nucleobond AX Miniprep- und Maxiprep Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

Die Messung der DNA-Konzentration sowie des Reinheitsgrads wird im Photometer NanoDrop durchgeführt. Dabei wird die Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml DNA. Der Quotient von 260 nm/280 nm gibt die Reinheit der DNA-Präparation an und sollte bei 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination, beispielsweise mit Proteinen, hin.

### **2.3.2. Enzymatische Restriktionsanalyse von DNA**

Zur Gewinnung definierter DNA-Fragmente werden Plasmide mit Restriktionsendonucleasen behandelt, welche an den spezifischen, meist palindromischen Sequenzstellen in einem Plasmid schneiden. Die Hydrolyse erfolgt nach der unten stehenden Zusammensetzung (Tab.: 3) und entsprechend der Vorgaben der Hersteller.

Tabelle 3: **Zusammensetzung einer enzymatischen Restriktionshydrolyse**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Menge</b>
10xPuffer	3 µL
10xBSA (nach Bedarf)	3 µL
Restriktionsenzyme (max.2)	1-3 µL (10-30 U)
DNA	1-10 µL (100 ng-1 µg)
ddH <sub>2</sub> O	auf 30µL

Zur Kontrolle der Hydrolyse werden 10 µL des Restriktionsansatzes mit einem 6xDye Puffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Fragmente werden aufgrund der angelegten Spannung ihrer Größe entsprechend aufgetrennt.

### 2.3.3. Isolierung der RNA aus Patienten Lymphozyten und Synthese der cDNA

Die aus dem Patienten isolierten Lymphozyten werden mit dem Lysis-Puffer versetzt und resuspendiert. Das gesamte Volumen wird für die RNA-Isolierung über ein QiAmp RNA Blood Mini Kit verwendet. Die RNA-Präparation erfolgt nach Vorgaben des Herstellers. Die Konzentration sowie Reinheit der isolierten RNA wird im Photometer gemessen. Die Reverse Transkription erfolgt mithilfe von SuperScript III der Firma Invitrogen nach dem Pippetierschema (Tab.: 4), wobei das Ansatzvolumen 25 µL beträgt.

Tabelle 4: **Komponentenzusammensetzung für die cDNA-Herstellung (I)**

Komponente	Volumen	Menge/ Konzentration
mRNA/ gesamt RNA	9 µl	50-250 ng bzw. 2-20 µg
random Primer (dN <sub>6</sub> ) (10 µM)	2,5 µl	1,0 µM
dNTP-Gemisch (je 2,5 mM)	5 µl	500 µM

Die Mischung wird 5 min bei 70°C inkubiert, um evtl. vorliegende Sekundärstrukturen der Primer und RNA aufzulösen. Danach wird der Ansatz auf Eis gestellt und in der Tabelle 4 zusammengefassten Reagenzien werden hinzugefügt.

Tabelle 5: **Komponentenzusammensetzung für die cDNA-Herstellung (II)**

Komponente	Volumen	Menge/ Konzentration
5x First-Strand-Puffer	5 µl	1x
0,1 M DTT	2,5 µl	10 mM
RNAse-Inhibitor RNaseOUT	1 µl	100 U
Superskript III Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl	200 U

Zur cDNA Synthese wird die Probe für 10 min bei RT und anschließend für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Deaktivierung der Reversen Transkriptase erreicht man durch Erhitzen des Ansatzes auf 70°C für 10 min. Die Lagerung der neu synthetisierten cDNA erfolgt bei -20°C. Des Weiteren soll die Qualität der cDNA in einer PCR mit universellen sowie spezifischen Primern kontrolliert werden.

### 2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der Vervielfältigung der DNA *in vitro* und erfolgt mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Dieser Prozess wird in drei Phasen unterteilt. Im ersten Schritt werden bei höheren Temperaturen die DNA-Doppelstränge aufgetrennt. Danach folgt bei einer

niedrigeren Temperatur die Anlagerung (Annealing) der Primer und anschließend wird bei einer mittleren Temperatur das DNA-Stück zwischen den Anlagerungsstellen der Primer amplifiziert. Die PCR wird mit den in den Tabellen 6 (a und b) aufgelisteten Substanzen durchgeführt. Als Template dienen Liagationsprodukte, cDNA oder Plasmide. Im Falle einer Kolonie-PCR wird zum PCR-Ansatz eine Bakterien-Kolonie hinzugefügt.

Bei der Primerhybridisierung (***primer annealing***) an die Zielsequenz ist die Wahl der richtigen Temperatur entscheidend, welche sich aus der freien Enthalpie der Bindungsstärken errechnen bzw. aus der Schmelzkurvenanalyse bestimmen lässt.

Tabelle 6a: **Komponenten zur Durchführung einer PCR**

PCR-Ansatz mit einer RedTaq Polymerase		PCR-Ansatz mit einer GreenTaq Polymerase	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
dNTPs (je 10mM)	1 µL	GreenTaq-Polymerase (Gemisch)	12 µL
10xRedTaq Puffer	2,5 µl	Oligonukleotid forward (10µM)	1 µL
RedTaq-Polymerase	1 µL (3U)	Oligonukleotid reverse (10µM)	1 µL
Oligonukleotid forward (10µM)	1 µL	Template-DNA (10-100ng)	1-5 µL
Oligonukleotid reverse (10µM)	1 µL	ddH <sub>2</sub> O	auf 25 µL
Template-DNA (10-100ng)	1-5 µL		
ddH <sub>2</sub> O	auf 25 µL		

Tabelle 6b: **PCR-Ansatz mit DNATaq Polymerase der Firma Fermentas**

Komponente	Menge
dNTP (je 10mM)	1 µL
DNATaq Polymerase	1 µL (3U)
MgCL <sub>2</sub>	1,25 µl
10xPuffer	5 µl
Oligonukleotid forward (10µM)	1 µL
Oligonukleotid reverse (10µM)	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µL

Die Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes ab. Die Temperaturstufen bzw. die Länge der einzelnen Schritte sind in Tabelle 7 erfasst.

Tabelle 7: **Temperaturverlauf einer PCR**

Zyklus	Zyklenzahl	Temperatur	Zeit
Initialisierung	1	94 °C	1 min
a. Denaturierung	25-30	94 °C	0,5 min
b. Primerhybridisierung ( <i>primer annealing</i> )		55-64 °C	1 min
c. Elongation		72 °C	1,5 min
	1	72 °C	10 min
Lagerung		4 °C	∞

### 2.3.5. DNA-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR-Produkte, DNA-Hydrolyse sowie zum Zweck der DNA-Aufreinigung werden die DNA-Fragmente in 1-2%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung eines Gels wird eine entsprechende Menge Agarose in einem TAE Puffer durch Erhitzen gelöst und in eine Gelkammer gegossen. Vor dem Auftragen auf das Gel werden die DNA-Proben bei Bedarf mit einem Gelladepuffer versetzt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (2 µl EthBr-Stammlösung pro 50ml Gel) zu der Agarose kann später die DNA im Gel mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Eine Spannung von ca. 100 V und eine Stromstärke von 400 A werden angelegt, bis eine ausreichende Auftrennung der DNA-Fragmente stattgefunden hat. Anschließend erfolgt die Detektion der Fluoreszenz mittels einer GelDoc Apparatur und die Auswertung des Bildes.

### 2.3.6. Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Sowohl die Vektoren als auch die Inserts sollen während der Klonierung aus den Lösungen bzw. Agarosegelen aufgereinigt werden, um die richtigen pH- und Salzbedingungen für die weiteren Schritte zu gewährleisten. Befinden sich die DNA-Moleküle bereits in einer Pufferlösung, wird diese auf eine Säule vom Nukleo Spin Extract II Kit aufgetragen und die DNA nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Bei DNA-Gemischen und PCR-Produkten werden die jeweiligen Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die Gelbereiche mit den gewünschten Fragmenten werden ausgeschnitten und diese mit den Nukleo Spin Extract II sowie GFX PCR DNA und Gel Band Purification Kit-Systemen aufgereinigt. Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit werden bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm im Photometer NanoDrop durchgeführt.

### 2.3.7. Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Die Dephosphorylierung der endständigen 5'-Phosphatgruppen linearisierter DNA erfolgt mittels alkalischer Phosphatase aus arktischen Garnelen (*Pandalus borealis*). Hierfür werden zu dem jeweiligen Ansatz 0,5 µL des Enzyms hinzugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase wird daraufhin vollständig und irreversibel durch 15 min Erhitzen bei 65°C inaktiviert.

### 2.3.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine Ligation werden ein Vektor sowie das zu klonierende DNA-Fragment mithilfe von Restriktionsendonucleasen hydrolysiert und durch die T4-Ligase in einem entsprechenden Puffer verknüpft. Dabei werden Vektor-DNA und Insert in einem molaren Verhältnis 1:3 zusammen gemischt, Ligase und Puffer hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei 16°C inkubiert (Tab.: 8). Die Menge des Inserts wird nach der unten stehenden Formel mal drei berechnet.

$$\text{Masse(Insert)} = \frac{\text{Masse(Vektor)} [\text{ng}] \cdot \text{Größe(Insert)} [\text{bp}]}{\text{Größe(Vektor)} [\text{bp}]}$$

Tabelle 8: Ligationsansatz zur Herstellung eines Konstrukts sowie zur Bibliothekproduktion

Komponente	bei Konstrukterstellung		bei Bibliothekerstellung mit pHAL14	
	Volumen	Menge	Volumen	Menge
Vektor	x µL	25-50ng	x µL	1000ng
Insert	y µL	3 zu1	y µL	250ng
Ligase Puffer (10x)	5µL	1x	10 µl	1x
Promega Ligase (3 U/µl)	1µL	3U	1µL	3U
ddH <sub>2</sub> O	Ad 50µL		Ad 100µL	

Der komplette Ligationsansatz wird für Hitzeschock-Transformation bzw. Elektroporation von Bakterien verwendet, welche schließlich auf eine mit Antibiotikum versetzte Agar-Platte ausgesäht werden. Nach 12-14 Stunden werden die einzelnen Kolonien analysiert.

### 2.3.9. DNA-Sequenzierung und Analyse

Die DNA-Sequenzierungen erfolgen mit dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger und werden von der Service-Abteilung des Georg Speyer Hauses (Margot Landersz, Dr. Ursula Dietrich) mit einem 3100 Avant *Genetic Analyzer* durchgeführt. Hierfür werden 500 ng DNA oder 10 µL aufgereinigtes PCR-Produkt mit 1 µL (10 mM) Primern versetzt und zur Sequenzierreaktion



verwendet. Die Sequenzanalysen wurden mittels Programms „Lasergene“ sowie anhand der öffentlichen Datenbanken wie BlastAlign und VBASE 2 durchgeführt.

## **2.4. Methoden der Zellkultur**

### **2.4.1. Allgemeine Kulturbedingungen**

Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen, innerhalb einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Inkubation sowie das Wachstum von Zellen erfolgt bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten, 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Die für die Arbeiten mit den Zellen verwendeten Materialien sowie Lösungen werden vor der Verwendung sterilisiert oder bereits steril bezogen.

### **2.4.2. Passagieren von Zellen (Suspension- und adhärenzte Zelle)**

Nach dem Erreichen einer Dichte von 80% werden die adhärenzten Zellen passagiert, wobei zuerst das verbrauchte Medium entfernt wird. Danach werden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche abgelöst, wobei dieser Vorgang durch leichtes Klopfen an die Flasche beschleunigt werden kann. Mit ca. 10 ml frischem Medium wird die Wirkung des Trypsins gehemmt und die Zellen werden durch mehrfaches Pipettieren vereinzelt. Anschließend wird 1 ml Zellsuspension in eine neue Flasche überführt und diese je nach Flaschenvolumen mit einer entsprechenden Menge Medium aufgefüllt.

Bei der Kultivierung von Suspensionszellen werden diese mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  ausgesät. Nach 3 bis 4 Tagen wird ein Teil der Zellen in eine neue Flasche überführt und mit frischem Medium versetzt.

### **2.4.3. Kryokonservierung von Zellen**

Um Zelllinien dauerhaft lagern zu können, werden  $5 \times 10^6$ -  $1 \times 10^7$  Zellen pelletiert, in 1 ml Kryokonservierungslösung, welches aus FCS und 10% DMSO besteht, aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Da DMSO toxisch auf die Zellen wirkt, sollen die Röhrchen sofort auf Trockeneis platziert werden. Die Lagerung erfolgt in einem Stickstoffgasphasenlagersystem bei -145°C.

### **2.4.4. Isolierung von PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) aus Blut**

Zur Isolierung der PBMC wird EDTA/Blut in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 1200 g für 10 min zentrifugiert. Danach bilden sich im Röhrchen zwei Phasen aus, wobei die obere gelbe

Phase das Serum enthält. In der unteren roten Schicht sammeln sich die Blutzellen. Das Serum wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Falls das Serum durch Erythrozyten verunreinigt ist, soll der Zentrifugationsvorgang wiederholt werden. Anschließend wird das Serum zu je 1 ml aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Blutzellen werden 1 zu 2 mit sterilem PBS verdünnt. 25 ml Ficoll, welches sich in einem 50 ml Falcon befindet, wird mit 25 ml Zellsuspension überschichtet. Die Falcons werden für 30 min bei 1200 g und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Danach bildet sich zwischen der PBS-Phase (gelb und durchsichtig) und Erythrozyten (rote Schicht) eine Interphase, welche die PBMC enthält. Diese Zellen werden vorsichtig abgesaugt und mit Erythrozyten-Lysispuffer vom QiAmp RNA Blood Mini Kit gewaschen. Anschließend werden die Zellen im Lymphozyten-Lysispuffer des gleichen Kits aufgenommen und zur RNA-Isolierung verwendet.

#### **2.4.5. Transiente Transfektion zur Herstellung von Viren und zur Proteinexpression**

Transiente Transfektion dient der Herstellung der pseudotypisierten Viren und erfolgt mittels einer Calcium-Phosphat-Methode, wobei Plasmid-DNA zum Zweck der transienten Genexpression in 293T Zellen eingeschleust wird. Bei dieser Methode werden DNA-Moleküle in Calcium-Phosphat-Kristalle integriert und schließlich von den Zellen durch Phagozytose aufgenommen. Unabhängig vom Transfektionsstyp ( $\gamma$ -retroviral oder lentiviral) werden die replikationsinkompetenten pseudoviralen Partikel mittels des sog. Drei-Plasmid-Systems hergestellt. Hierbei kodieren die Plasmide verschiedene genetische Information. Das Transferkonstrukt weist das Transgen (GFP), das virale Verpackungssignal ( $\Psi$ ) und LTRs (*long terminal repeats*) auf, allerdings keine genetische Information zur Expression viraler Proteine. Die zwei weiteren Plasmide liefern die Information zum einen für Strukturproteine sowie virale Enzymfunktionen (GagPol) und zum anderen für das gewünschte Hüllprotein (GPC). Sie enthalten jedoch keine Verpackungssignale. Wie aus der Zusammensetzung hervorgeht, können zwar virale Proteine produziert und Virionen ausgebildet werden, die viralen Gene werden allerdings aufgrund des fehlenden Verpackungssignals nicht in das Virus eingebaut. Dies verhindert die Ausbreitung der Partikel und beschränkt die Infektion auf einen einzigen Zyklus.

Vierundzwanzig Stunden vor einer Transfektion werden  $5 \times 10^6$  293T Zellen in 10 cm-Petrischalen in einem Volumen von 8 ml Standard-DMEM ausgesät. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wird das Medium zwei Stunden vor der Transfektion von den Zellen entfernt und gegen frisches Standard-DMEM mit Chloroquin (25  $\mu$ M Endkonzentration) ausgetauscht. Dies hat zur Folge, dass DNasen inhibiert werden, was zu einer höheren DNA-Stabilität in den transfizierten Zellen führt (Luthman and Magnusson 1983).

Die Zusammensetzung für einen Transfektionsansatz ist in der Tabelle 9 zusammengefasst. Die DNA-Mischung wird mit  $\text{CaCl}_2$  versetzt und auf 500  $\mu$ L mit Wasser aufgefüllt. Unter ständigem

Vortexen wird diese Lösung zu den 500 µL 2xHBS-Puffer hinzugegeben und bei RT inkubiert (20 min), wobei sich DNA-haltige Calciumphosphatpräzipitate bilden. Diese Komplexe werden zu den Zellen zugetropft und durch langsames Schwenken der Schale verteilt. Acht Stunden später erfolgt ein Mediumwechsel (DMEM mit 20% FCS) und die Zellen werden weitere 24 Stunden inkubiert. Die Virion-haltigen Überstände werden 32 und 48 Stunden nach der Transfektion gesammelt.

**Tabelle 9: Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes zur Herstellung von pseudotypisierten viralen Partikeln**

Komponente/10 cm-Petrischale	Menge
Transferplasmid	7 µg
GagP(ol-Plasmid	12 µg
GPC(Env) -Plasmid	1 µg (retro); 2 µg (lenti)
CaCl <sub>2</sub>	50 µL (2,5 M)
ddH <sub>2</sub> O	auf 500 µL
2xHBS Puffer	500 µl

Die Produktion der löslichen Proteine erfolgt ebenfalls mit der Calcium-Phosphat-Methode in HEK 293H Zellen, wobei hierfür nur ein Plasmid für die Transfektion eingesetzt wird. Zur Kultivierung der HEK 293H Zellen wird das serumfreie Medium Panserin 293 A verwendet, welches keine Zusätze, wie FCS, benötigt. Um eine bessere Haftung der Zellen zu gewährleisten, werden die 10 cm Schalen mit Poly-Lysin (10 mM) beschichtet und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Schalen gründlich mit sterilem PBS gewaschen.

Am Tag vor der Transfektion werden  $5 \times 10^6$  HEK 293H Zellen in 8 ml Panserin 293 A Medium ausgesät. Zwei Stunden vor dem Versuch wird das Medium gewechselt, wobei das frische Medium mit Chloroquin (25 µM Endkonzentration) versetzt ist. Der Transfektionsvorgang wird wie oben beschrieben durchgeführt. Die Zusammensetzung der Komponente wird in der Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10: Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes zur Produktion löslicher Proteine**

Komponente/10 cm-Petrischale	Menge
Transferplasmid	10 µg
CaCl <sub>2</sub>	50 µL (2,5 M)
ddH <sub>2</sub> O	auf 500 µL
2xHBS Puffer	500 µl

Die proteinhaltigen Überstände werden 48 Stunden nach Transfektion gesammelt und bei 2000 g und 4°C zentrifugiert, um die Zellreste zu entfernen. Zur dauerhaften Lagerung werden die Überstände bei -20°C eingefroren.

#### **2.4.6. Herstellung der CD20/CD34 positiven Zellen und deren Anreicherung durch magnetische Zellseparation (MACS)**

Die CD20/CD34 positiven Zellen dienen der Erzeugung viraler Partikel, welche während der Knospung die beiden Marker in virale Hülle einbauen sollen. Für die Produktion CD20/CD34 positiver Zellen werden  $1 \times 10^5$  293T Zellen pro Well ausgesät und 24 Stunden später mit retroviralen Partikeln (MOI 1; 0,5 und 0,2), welche ein Transferplasmid mit dem CD20/CD34 Marker kodierendes Gen tragen, infiziert. Damit sollte eine Zelltransduktion von 20% erzielt werden. Die Zellen werden bei 1700 g und 30°C eine Stunde zentrifugiert. Zusätzlich sollen nicht transduzierte Zellen mitgeführt werden. Die Inkubation erfolgt über vier Tage bei 37°C. Am Tag 5 werden die Zellen gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst.  $1 \times 10^5$  Zellen von jeder Probe werden mit PE-Cy5.5-konjugierten anti-CD34 bzw. PE-konjugierten anti-CD20 Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als negative Kontrolle dienen die nicht transduzierten mit anti-CD34 bzw. anti-CD20 Antikörpern gefärbten Zellen zur Ermittlung des Hintergrundsignals. Die Zellen aus dem Ansatz, welcher eine Transduktionrate von 20% aufweist, werden weiter verwendet.  $5 \times 10^7$  solcher Zellen werden in 300 µL MACS-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Danach werden 20 µL FcR Blocking Reagenz und 20 µL CD34 MicroBeads der Firma Miltenyi Biotec hinzugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit MACS Puffer gewaschen und 100 µL Zellsuspension werden durch den MACS-Filter vereinzelt, um Klumpen zu entfernen. Die restlichen Zellen sollen für die durchflusszytometrische Analyse aufbewahrt werden.

Zur Selektion CD20/CD34 positiver Zellen wird ein vorgekühltes MACS LD Röhrchen auf einem geeigneten MACS-Magnet Ständer befestigt und mit MACS-Puffer gewaschen. Die vereinzelt Zellen werden in das Röhrchen zugegeben. Nach dem Durchlauf werden die gebundenen Zellen zweifach gewaschen. Das Röhrchen wird entnommen, in ein Falcon gestellt und die Zellen werden unter Druck in dieses Falcon überführt. Bei Bedarf wird der Vorgang wiederholt.

Zur Kontrolle der Selektion im Durchflusszytometer werden vier verschiedene Proben ( $1 \times 10^5$  Zellen) vorbereitet: die nicht transduzierten Zellen als Hintergrund; die transduzierten mit anti-CD34 Antikörpern markierten Zellen; die transduzierten mit anti-CD34 Antikörpern markierten und an die MicroBeads gebundenen Zellen vor der Selektion über die Säule; die transduzierten mit anti-CD34 Antikörpern markierten und an die MicroBeads gebundenen Zellen nach der Selektion über Säule. Der Anteil der CD20/CD34 positiven Zellen nach der Selektion soll über 90% liegen. Die restlichen sortierten Zellen werden in DMEM mit 10% FCS aufgenommen und eine Woche inkubiert.

Da die MicroBeads aus Eisenoxid bestehen und eine Hülle aus Polysacchariden aufweisen, an welcher Antikörper gebunden sind, sind sie biologisch abbaubar und werden nach wenigen Tagen von den Zellen abgestoßen.

#### **2.4.7. Aufkonzentrierung von Viruspartikeln**

Die Aufkonzentrierung der viralen Partikel wird mittels Ultrazentrifugation durchgeführt. Hierfür werden 30 ml des filtrierten Überstandes in ein ÜZ-Röhrchen überführt und vorsichtig mit 5 ml einer 20%igen Saccharose/PBS-Lösung unterschichtet. Die Zentrifugation erfolgt bei 25000 g und 4 °C für 2 Stunden. Der Überstand wird verworfen und das Partikelsediment wird in 120 µL PBS-Puffer aufgenommen und durch Schütteln bei 250 rpm über Nacht resuspendiert. Zur Lagerung werden die Überstände aus mehreren Röhrchen gepoolt, zu je 100 µL aliquotiert und bei –80 °C eingefroren.

#### **2.4.8. Transduktion von Zellen zur Titerbestimmung der viralen Partikel**

Der virale Titer lässt sich über die Expression eines GFP-Gens proportional zur Fluoreszenz des Proteins bestimmen. Hierfür werden je nach Tropismus der hergestellten pseudotypisierten Viren  $2 \times 10^5$  Suspensionszellen bzw.  $2 \times 10^4$  adhärenenten Zellen (Tab.: 11) pro Vertiefung in einer 48 Wellsplatte ausgesät (500 µL Medium).

Tabelle 11: **Titration der viralen Überstände auf entsprechenden Zelllinien**

Virus	Transfektion	Zellen für Titerbestimmung
VSV	Lenti	PM1
HIV	Lenti	PM1
HCV	Lenti	HuH7
LCMV	Lenti/γ-retro	TE671
Influenza	Lenti/γ-retro	A596
MLV	γ-retro	L697
LASV	Lenti/γ-retro	TE671

Als nächstes wird eine Verdünnungsreihe mit viralen Überständen vorbereitet in Medium. Erfahrungsgemäß kann der Titer für verschiedene Partikel im Bereich von  $10^6$ - $10^8$  liegen. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit zwei Titrationsreihen verwendet.

Reihe 1	1:100	1:200	1:1000	1:2000	1:10000	1:20000
Reihe 2	1:1000	1:2000	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000

Die viralen Partikel werden in Duplikaten titriert. Die Virus-haltigen Überstände werden zu den Zellen zugegeben, so dass das Endvolumen in einer Vertiefung 1 ml beträgt.

Danach erfolgt ein einstündiger Zentrifugationsschritt bei 31 °C und 650 g (für Suspensionzellen) bzw. 1200 g (für adhärente Zellen), wodurch eine bessere Inokulierung der Zellen mit den Viruspartikeln gewährleistet wird. Anschließend wird das Medium gewechselt und die Zellen werden weitere 4-5 Tage inkubiert. Für die Messung werden die Zellen in die FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer gewaschen und in 200 µL des gleichen Puffers aufgenommen. Als Referenz dienen nicht transduzierte Zellen. Die Messung erfolgt im Durchflusszytometer. Bei der Berechnung des Titers (siehe Formel) wird der Verdünnungsfaktor mit einbezogen, bei welchem die Anzahl der GFP-positiven Zellen zwischen 3% und 10% liegt.

$$\frac{\text{Infektiöse Partikel}}{\text{ml}} = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Anzahl der ausgesäten Zellen} \times \frac{\% \text{ positiver Zellen}}{100\%}$$

#### 2.4.9. Färbung von Zellen und Beads, Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie-Methode ermöglicht es, die Bestandteile einer Zellsuspension sowie kleine Partikel, wie magnetische Beads, schnell und genau nach morphologischen Eigenschaften wie Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität zu differenzieren. Die vereinzelt Partikel wandern durch eine Messküvette und passieren dabei einen fokussierten Laserstrahl. Dadurch finden Absorptions- und Lichtstreuungsprozesse statt, die in ein spezifisches Signal umgewandelt werden. Während das vorwärts gestreute Licht [Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*)] sich proportional zur Zellgröße verhält, charakterisiert das seitwärts gestreute Licht [Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sidewards Scatter*)] die Größe und Struktur des Zellkerns und die Granularität der Zelle.

Durch die Expression fluoreszierender Proteine wie GFP oder durch eine Immunfärbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern bzw. Liganden werden die Zellen bzw. Beads mit dem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt und die Fluoreszenzsignale über einen Lichtdetektor registriert, wobei die Fluoreszenzintensität zur Anzahl der fluoreszierenden Moleküle proportional ist.

Beim Vorhandensein eines intrazellulären Fluorophors werden die Zellen direkt von der Platte bzw. Schale in ein FACS-Röhrchen überführt, zweifach mit FACS-Puffer gewaschen und bei 1200 g sedimentiert. Anschließend werden die Zellen in 200 µL FACS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und gemessen.

Für die Immunfärbung werden  $1 \times 10^6$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und in gleicher Weise vorbereitet. Das Sediment wird mit den primären Antikörpern bzw. Seren 30 min bei 4 °C inkubiert, zur Entfernung der überflüssigen Antikörper zweifach mit FACS-Puffer gewaschen und bei 1200 g pelletiert. Die Zellen werden in Sekunderantikörperlösung aufgenommen und weitere 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach den Waschschritten werden die Zellen mit 200 µL FACS-Puffer versetzt und im Durchflusszytometer analysiert.

Bei der Färbung von magnetischen Beads wird die benötigte Menge in ein 2 ml Röhrchen überführt. Die Inkubation mit den Antikörpern bzw. Liganden erfolgt unter permanentem Rotieren. Zum Pelletieren der Beads werden Tubes in einen Magnetständer platziert. Nach einer Sedimentierungszeit von 1-2 min kann der Überstand verworfen und die Beads für weitere Schritte verwendet werden.

#### **2.4.10. Neutralisationsassay**

Die (Kreuz-)neutralisierenden Eigenschaften verschiedener Seren sowie selektionierter scFv-Fragmenten werden in einem Neutralisationstest analysiert. Hierfür werden  $2 \times 10^4$  Zellen in eine 48 bzw. 24 Vertiefungen-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wird eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Seren mit Medium angesetzt. Zu den jeweiligen Serum-Verdünnungen werden die viralen pseudotypisierten Partikel (MOI 0,1) zugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert, wobei das Endvolumen in den Vertiefungen 100 µl beträgt. Danach wird der Serum-Virus-Ansatz auf 1 ml mit Medium aufgefüllt und jeweils 500 µl davon werden zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden bei 1750 g und 30 °C eine Stunde zentrifugiert. Anschließend wird das virushaltige Medium entfernt und frisches hinzugegeben.

Zur Charakterisierung der neutralisierenden Eigenschaften der scFv-Fragmente werden die aufgereinigten Antikörper-haltigen bakteriellen Überstände (Kap.: 2.2.9) (ca. 1mL) mit viralen pseudotypisierten Partikeln (MOI 0,1) eine Stunde bei RT inkubiert und schließlich auf die Zellen pipetiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1200 g erfolgt ein Mediumwechsel (DMEM mit 10% FSC).

Die transduzierten Zellen werden 72-96 Stunden in einem Brutschrank inkubiert. Danach werden die Zellen gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und in ein FACS-Röhrchen überführt.

Nach der Messung in dem Durchflusszytometer wird die Neutralisationskapazität des Spenderserums bzw. des scFv-haltigen Überstandes durch Reduktion des GFP-Signals in den mit pseudotypisierten Viren infizierten Zellen mithilfe der unten stehenden Formel bestimmt, wobei die Neutralisationswerte auf die des negativen Serum-Pools bzw. des negativen scFv normalisiert werden.

$$\text{Neutralisationskapazität (\%)} = 100 - \frac{\text{Fluoreszenz (\%)} A \times 100}{\text{Fluoreszenz (\%)} B}$$

Dabei steht B für einen Fluoreszenzwert, welcher durch die Infektion der Zellen mit reinen Viren erzielt wurde, während A für einen Wert steht, welcher in einer Probe gemessen wurde, in der die für die Zellinfektion eingesetzten Viren mit einem scFv-haltigen Überstand bzw. einem positiven Serum präinkubiert wurden.

Die inhibitorische Kapazität der Serumproben wird durch den IC50 Wert (mittlere inhibitorische Konzentration) dargestellt, welcher mithilfe der Software für wissenschaftliche Analysen GraFit 7 ermittelt wird. Dabei entspricht der IC50 Wert der Konzentration eines Inhibitors, bei welcher eine halbmaximale Reaktionshemmung beobachtet wird.

#### **2.4.11. Zytotoxizitätsassay**

Bei Zytotoxizität handelt es um Eigenschaften von Substanzen, welche auf die Zelle wirken und letztendlich den Zelltod auslösen. Im Rahmen dieser Arbeit werden die zytotoxischen Eigenschaften der isolierten scFv-Fragmente getestet. Hierfür werden am Vortag  $2 \times 10^4$  Zellen in einer 24 Vertiefungen-Platte ausgesät. Die aufgereinigten scFv-haltigen bakteriellen Überstände werden mit dem gleichen Volumen an Medium zusammengemischt und den Zellen zugefügt. Danach werden diese bei 1700 g und 30°C zentrifugiert und das Medium wird gewechselt. Anschließend werden die Zellen 3 bis 4 Tage bei 37°C inkubiert. Zur Messung werden 100 µL Zellüberstand in eine lichtdichte ELISA-Platte überführt, 100 µL AAF-Glo Reagenz von CytoTox-Glo Cytotoxicity Kit hinzugefügt und 15 min inkubiert. Die Analyse erfolgt im Luminometer. Als Hintergrund werden die Signale von nicht behandelten Zellen gesetzt. Zur positiven Kontrolle sollen die nicht behandelten Zellen zuerst mit Lysis Reagenz und danach mit AAF-Glo Reagenz versetzt werden.

### **2.5. Biochemische Methoden**

#### **2.5.1. Immobilisieren von Viren direkt an Beads und auf ELISA-Platten**

Für die Antigenpräsentation werden die pseudotypisierten Viren an die Beads gekoppelt. Hierfür wird die benötigte Beadsmenge entnommen, in ein 2 mL Gefäß überführt und gewaschen, wobei zum Sedimentieren das Röhrchen in einem Magnetständer platziert wird. Danach werden die viralen Partikel zu den Beads hinzugefügt und unter ständigem Rotieren bei 4°C über Nacht bzw. vier Stunden bei RT inkubiert. Die Rotation sorgt für gleichmäßige Bindung der viralen Partikel an die Beads. Die Reaktionsgefäße werden erneut am Magnetständer befestigt und nach dem Separieren der Beads wird der Überstand mit nicht gebundenen Partikeln vorsichtig entfernt. Das Absättigen der freien Bindungsstellen erfolgt mit 5% BSA in PBS bei 4°C. Anschließend werden die an den Beads gebundenen Viren für die Immunfärbung mit verschiedenen Seren oder monoklonalen Antikörpern verwendet.



Für die direkte Bindung der viralen Partikel auf eine ELISA-Platte werden diese in verschiedenen Mengen in die Vertiefungen gegeben und über Nacht inkubiert. Danach werden die freien Bindungsstellen 2 bis 3 Stunden mit 5% BSA in PBS bei 4 °C abgesättigt. Die Bindung der viralen Partikel wird in einem ELISA-Test analysiert.

### **2.5.2. Immobilisieren von Viren indirekt via Biotin-Streptavidin-Bindung**

Um die Bindungskapazität der viralen Partikel zu erhöhen, werden diese mit Biotin inkubiert und schließlich an, mit Streptavidin beschichtete, magnetische Beads gekoppelt. Die Biotinmenge wird über die Oberfläche von Viren berechnet, wobei der Durchmesser eines Lassa Virions ca. 100 nm beträgt. Nach dem Protokoll von Thermo-Scientific wird für  $2,5 \times 10^7$  adhärenente Zellen, deren Durchmesser bei 30-40 µm liegt, ca. 1 mg Biotin eingesetzt. Aus diesem Verhältnis kann die Biotinmenge für  $1 \times 10^8$  virale Partikel, deren Gesamtoberfläche ca.  $3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  beträgt, errechnet werden. Der abgerundete Wert ist 0,05 µg Biotin pro  $1 \times 10^8$  Viren. Allerdings geht aus den Erfahrungen hervor, dass in einer aufkonzentrierten Probe ein großer Anteil an nicht infektiösen Viren bzw. *virus-like* Partikeln vorhanden ist. Um die Sättigung bei der Biotinylierung zu erreichen, wird die berechnete Biotinmenge um das 100-fache erhöht.

Für die Biotinylierung werden die Viren auf Eis aufgetaut, mit entsprechender Biotinmenge versetzt und auf Eis eine Stunde inkubiert. Anschließend werden die Ansätze in die Slides der Firma Thermo Scientific mit entsprechenden Porengrößen (3000 MW) für Dialyse überführt. Die Dialyse dient zur Entfernung des überschüssigen nicht gebundenen Biotins. Hierfür werden die Slides in einem Schwamm eingeklemmt und in ein Gefäß mit 5 L PBS platziert, so dass 2/3 der Slidesoberfläche in der Lösung eingetaucht sind. Unter ständigem Rühren werden die biotinylierten Partikel ca. zwei Stunden dialysiert. Danach erfolgt ein Pufferwechsel und die Dialyse wird über Nacht fortgesetzt. Am dem darauf folgenden Tag wird der Puffer dekantiert und die biotinylierten Pseudopartikel in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Im nächsten Schritt werden Streptavidin konjugierte magnetische DynaBeads in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit PBS gewaschen, wobei zum Sedimentieren ein Magnetständer verwendet wird. Die biotinylierten Viren werden mit Beads zwei Stunden bei 4 °C unter ständigem Rotieren inkubiert. Die Rotation sorgt für eine gleichmäßige Bindung der viralen Partikel an die Beads. Nachdem die Reaktionsgefäße an einem Magnetständer befestigt sind, wird der Überstand mit nichtgebundenen Partikeln entfernt. Anschließend erfolgt die Immunfärbung der immobilisierten Viren mit Antikörpern bzw. Seren und einem entsprechenden Fluorochrom. Die Proben werden in einem Durchflusssytometer analysiert.

---

### **2.5.3. Produktion und Immobilisierung von löslichen Proteinen**

Die proteinhaltigen Überstände werden gesammelt und bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert, um die Zellreste zu entfernen. Für eine dauerhafte Lagerung wird der Überstand aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Für die Proteinextraktion werden 400 µL Überstand in ein 2 mL Röhrchen überführt und 400 µL Methanol und 100 µL Chloroform hinzugegeben. Nach dem Vortexen wird die Suspension für 2 min bei 13000 g zentrifugiert. Die Proteine erscheinen als eine weiße Interphase zwischen Chloroform und Methanol/Wasser. Die Methanol/Wasser Phase wird vorsichtig entfernt und 400 µL Methanol werden wieder hinzugegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation werden die Proteine als ein weißes Pellet erkennbar. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und die Proteine an der Luft getrocknet. Für weitere Analysen wird das Pellet in PBS Puffer aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.5.4. ELISA Test**

Der Immunadsorptionstest (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay) basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion und dient dem Nachweis der Wechselwirkung von Antigen und Antikörper. Für eine direkte Kopplung der viralen Partikel auf die Platten werden diese in einem PBS Volumen von 300 µL in eine Vertiefung hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die freien Bindungsstellen werden zwei Stunden bei RT mit 5% BSA in PBS abgesättigt. Der Nachweis der gebundenen Partikel erfolgt je nach Methode mit Seren oder monoklonalen Antikörpern, wobei die Inkubationszeit zwei Stunden beträgt. Um die Spezifität der Bindung zu erhöhen, kann die Platte über diese Zeit bei 4 °C aufbewahrt werden. Aufgrund schwacher Virusbindung auf die Plattenoberfläche werden die Waschschrte schonend per Hand durchgeführt. Die Anzahl der Schritte hängt von dem jeweiligen Versuch ab und kann bis zu 30-fach wiederholt werden. Zu Visualisierung werden die mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten Zweitantikörper hinzugegeben und eine Stunde inkubiert. Nach den Waschschrten wird die Farbreaktion durch die Zugabe von 100 µl des Peroxidase-Substrates pro Vertiefung (TMB-Tetramethylbenzidin) ausgelöst (Blaufärbung). Die Reaktion wird mit 100 µl 3%-iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder TMB-Stop-Lösung gestoppt (Gelbfärbung). Anschließend erfolgt die Extinktionmessung an einem Photometer bei 450-650 nm.

Bei der Immobilisierung von biotinylierten Partikeln werden die Vertiefungen mit 300 ng Streptavidin in 300 µL PBS beschichtet (4 °C; ÜN). Die Partikel in entsprechenden Mengen werden hineingegeben. Danach erfolgt, wie oben beschrieben, der Bindungsnachweis der viralen Partikel mit Biotin bzw. spezifischen Seren (Antikörpern).

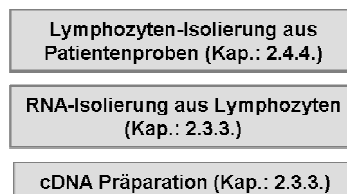
### 2.5.5. Western Blot

Für Proteinnachweis im Western Blot werden die Proben mit einem Ladepuffer ohne DTT (Dithiothreitol) versetzt, gemischt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wird eine entsprechende Probenmenge auf ein SDS Gel aufgetragen und bei 130 V eine Stunde aufgetrennt. Danach werden die Proteine im „semi-dry“ Verfahren bei 120 mA auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wird die Nitrozellulosemembran eine Stunde bei RT mit 5% BSA in PBS abgesättigt und anschließend mit primären Antikörpern versetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C. Nach einem 5-fachen Waschen mit PBS werden die sekundären mit APC konjugierten Antikörper in 2% BSA in PBS hinzugegeben und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach den wiederholt durchgeführten Waschschritten werden Proteine mittels einer NBT Lösung der Firma Rosche auf der Membran visualisiert.

### 2.5.6. Methodenübersicht

Da die einzelnen Versuche aus mehreren Schritten bestehen und molekularbiologische, mikrobiologische und biochemische Methoden sowie Zellkulturtechniken vereinen, sind in den nachfolgenden Abbildungen zwei große Arbeitsabschnitte zusammenfassend dargestellt. Die Abbildungen enthalten zudem Hinweise auf die jeweiligen Kapitel in der vorliegenden Arbeit.

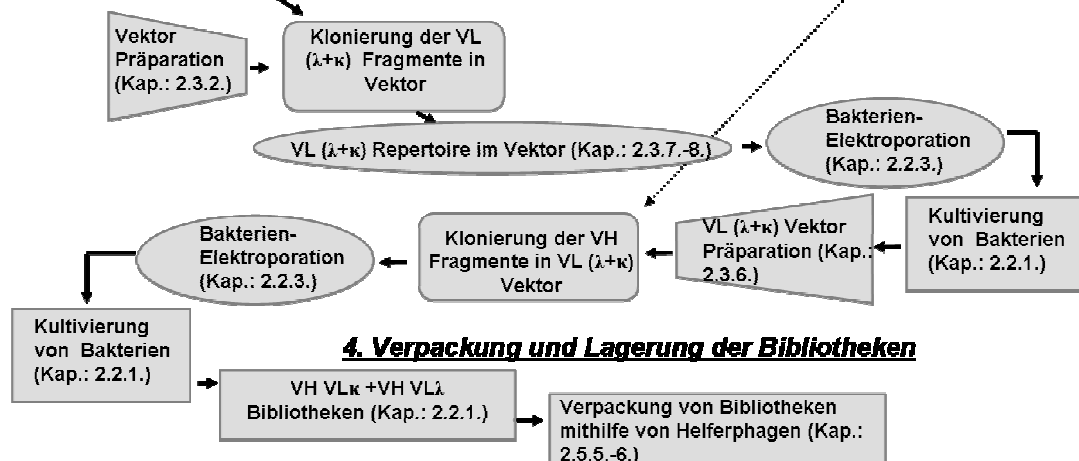
#### 1. Isolierung des genetischen Materials aus Patientenproben



#### 2. Genamplifikation der leichten und der schweren Ketten



#### 3. Zwei-Schritte-Klonierung in pHAL 14 Vektor



#### 4. Verpackung und Lagerung der Bibliotheken

Abbildung 15: Herstellung einer Immunbibliothek aus den Lymphozyten des Lassa Fieber Patienten.

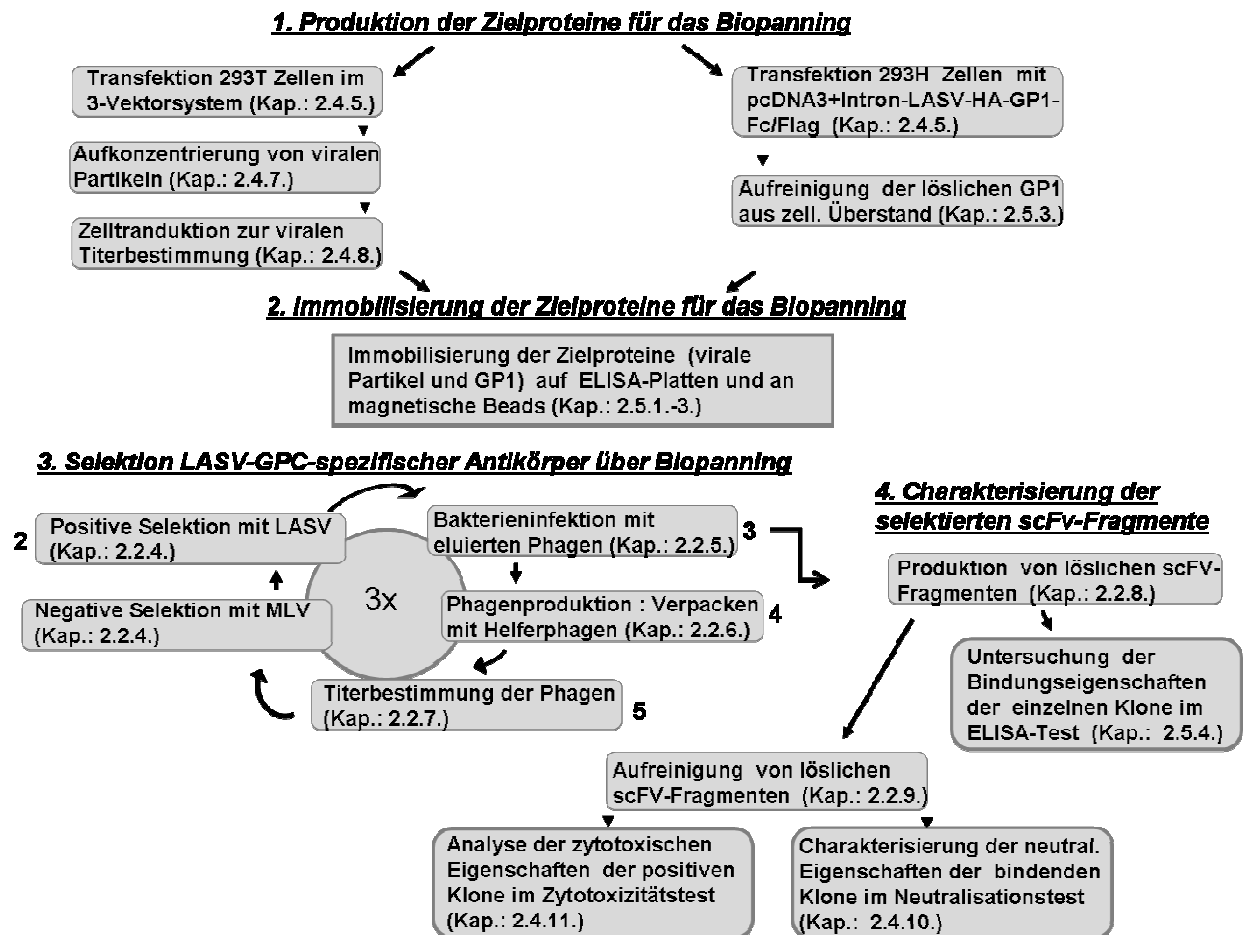


Abbildung 16: Herstellung der Zielproteine für Biopanning und Selektion LASV-GPC-spezifischer Antikörper.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klinische Daten des Lassa Fieber Patienten

Der Patient erkrankte an Lassa Hämorrhagischem Fieber am 20.06.2006 und wurde am 21.07.2006 in die Klinik der Goethe Universität eingeliefert. Dort wurde er mit Ribavirin für ca. 2 Wochen behandelt. Zur Zeit der Einlieferung betrug die Viruslast im Blut  $10^{3.6}$  Kopien/mL. Die Aspartat-Aminotransferase (ASAT) Werte im Serum lagen bei 150 U/L. Dabei ist zu beachten, dass der Referenzwert nach IFCC (bei 37°C) bei  $< 52$  U/L liegt. Die erhöhten ASAT Werte deuteten auf Entzündungsprozesse in Leber, Herz- oder Skelettmuskulatur hin. Der Patient überlebte die Infektion und die Viruslast im Urin und Plasma lag nach der Behandlung mit Ribavirin unter der Nachweisgrenze. Diese klinischen Daten wurden mir von Dr. S. Schilling und Prof. Dr. H.-D. Brodt, den behandelten Ärzten der Goethe Universitätsklinik zur Verfügung gestellt.

Zur Zeit der Erkrankung und in den nachfolgenden Jahren wurde Blut zur Analyse des Antikörpertiters entnommen. Die erste Blutprobe stammt aus der Zeit der akuten Erkrankung. In der Tabelle sind die Zeitpunkte der weiteren Blutabnahmen zusammengefasst.

Tabelle 12: **Serumproben des Lassa Fieber Patienten aus dem Zeitraum Juli 2006 – Mai 2010.**

Zeit der Blutabnahme	Proben
Juli 2006	Serum I
Januar 2007	Serum II
April 2008	Serum III
Mai 2009	Serum IV
Mai 2010	Serum V

#### 3.2. Analyse der Lassa GCP-spezifischen Antikörper in den Patientenseren

Um den Titer der bindenden Antikörper zu bestimmen, wurden die LASV-GPC stabil transfizierten sowie die LASV-GPC negativen 293T Zellen bei 4°C eine Stunde mit Verdünnungen verschiedener Seren inkubiert und nach der Immunfärbung mit anti-humanen PE-gekoppelten Antikörpern im Durchflusszytometer gemessen (Kap.: 2.5.9). Die Mittelwerte wurden anhand der Werte aus drei unabhängigen Messungen ermittelt.

Es ist deutlich zu erkennen (Abb.: 17), dass der Titer der bindenden Antikörper in der ersten Probe (Serum I) vergleichsweise niedrig ist. In dem darauf folgenden Jahr stieg der Titer (Serum II) an und die erhöhte Antikörper-Anzahl im Patientenserum hielt in den nächsten 3 Jahren an.

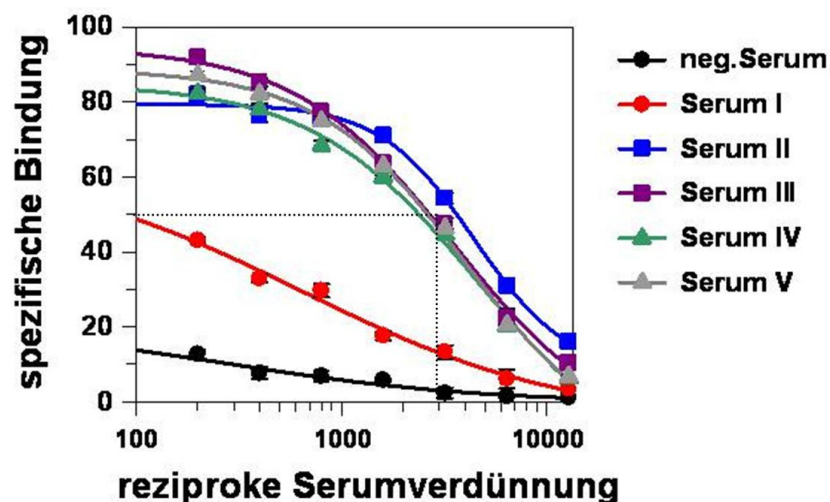


Abbildung 17: **Titer der bindenden Antikörper in den Patientenseren.** Die Titerbestimmung der bindenden Antikörper erfolgte auf den mit Lassa-GPC stabil transfizierten 293T Zellen.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden mit verschiedenen Serumverdünnungen 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden mit anti-humanen PE-gekoppelten Antikörpern (Verdünnung 1:25) gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Mittelwerte wurden anhand der Werte aus drei unabhängigen Versuchen bestimmt. Als negative Kontrolle dienten die nicht transfizierten 293T Zellen. Der Hintergrund ist subtrahiert.

Die halbmaximale Bindung lag in den Proben Serum II und Serum V bei einer Verdünnung von 1:1200-1:1400. Signifikante Unterschiede zwischen den Proben der letzten drei Jahre konnten nicht festgestellt werden.

Die neutralisierenden Eigenschaften der Patientenseren wurde *in vitro* in einem Neutralisationsassay untersucht. Als Maß zur Beurteilung der Neutralisationskapazität wurde der IC 50 Wert festgelegt, d.h. diejenige reziproke Serumverdünnung bei einer 50% Neutralisation stattfindet.

Für die Neutralisationsstudien wurden ein GPC pseudotypisierter heterologer Lassa Fieber Virus (LASV) sowie ein *Env* homologer Murine Leukämie Virus (MLV) Partikel verwendet, wobei die MLV Partikel als negative Kontrolle dienten. Bei den Lassa Partikeln handelt es sich um Viren, welche virale Glykoproteine vom Lassa Stamm Josiah in ihrer Hülle tragen, wobei dieser Stamm mit Lassa Viren aus dem Patienten die höchste Homologie aufwies (Dr. S. Günther, persönliche Mitteilung). Die viralen Partikel (MOI 0,1) wurden mit verschiedenen Serumverdünnungen eine Stunde bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Infektion der TE 671 bzw. L929 Zelllinien. Anschließend wurde die GFP-Fluoreszenz in den Zellen im Durchflusszytometer gemessen (Kap.: 2.5.9-10). Zu beachten ist, dass die Werte der unspezifischen Neutralisation der MLV Partikel bzw. die Probenwerte mit negativem Serum-Pool (Hintergrundfluoreszenz) unmittelbar bei der Titerbestimmung von den positiven Neutralisationswerten der LASV Partikel subtrahiert wurden. Die Ermittlung der Mittelwerte erfolgte anhand der Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie Abbildung 18 zeigt, konnten im Serum I keine signifikanten neutralisierenden Aktivitäten gemessen werden. In der späteren Probe (Serum II) stieg der Titer der neutralisierenden Antikörper an und blieb über drei Jahre erhalten. Der IC<sub>50</sub> Wert der Proben Serum II-V lag bei 25-30. Diese Ergebnisse stimmen mit den in der Arbeitsgruppe von Dr. S. Günther (Bernhart-Nocht Institut, Hamburg) erzielten Daten überein (persönliche Mitteilung).

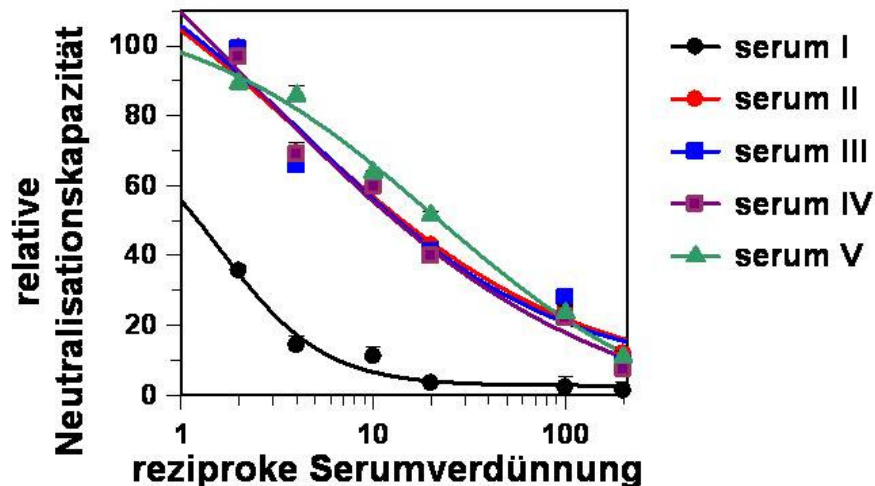


Abbildung 18: **Titer der neutralisierenden Antikörper in den Patientenseren.** Die Lassa GPC pseudotypisierten Viruspartikel (Josiah-Stamm) und MLV Partikel (MOI 0,1) wurden mit verschiedenen Serumverdünnungen eine Stunde bei RT inkubiert und zu den TE 671 (für LASV) bzw. L929 (für MLV) Zellen gegeben. Die Messung der GFP-Expression in den Zellen erfolgte 72 Stunden nach der Infektion im Durchflusszytometer. Die Ermittlung der Mittelwerte erfolgte anhand der Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Der Hintergrund ist subtrahiert.

Um das Wirkungsspektrum der neutralisierenden Antikörper bezüglich der Neutralisationsbreite zu untersuchen wurden weitere heterologe pseudotypisierte Lassa Fieber Viren eingesetzt. Dabei handelt es sich um die Stämme AV, NL und CSF, wobei das genetische Material (GPC-DNA) von Dr. S. Günther zur Verfügung gestellt wurde. Davon ausgehend wurden die entsprechenden pseudotypisierten Lassa Viren hergestellt. Die Bestimmung der Kreuzneutralisationskapazität im Patientenserum erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema, wobei nur Serum III getestet wurde. Auch in Kreuzneutralisationstests wurden die MLV Partikel bzw. der negative Serum-Pool als negative Kontrolle eingesetzt. Bei der Ermittlung der Kreuzneutralisationskapazität wurden die Werte der negativen Kontrollen von den Werten der positiven Proben subtrahiert.

Die IC<sub>50</sub> Werte für die kreuzneutralisierenden Antikörper in Serum III lagen bei 20 für den AV Stamm und 30 für die CSF und NL Lassa Stämme. Somit waren diese mit den IC<sub>50</sub> Werten der Seren II-V in Abbildung 19 vergleichbar (Abb.: 19). Dies zeigt, dass die im Patientenserum vorhandenen neutralisierenden Antikörper in der Lage sind konservierte Epitope in heterologen Lassastämmen zu erkennen.

Da über die LASV-spezifischen Antikörper nur wenig bekannt ist, sowohl in Hinsicht auf diagnostische als auch therapeutische Anwendung, sollten die Lassa-GPC-spezifischen Antikörper unseres Patienten identifiziert werden.

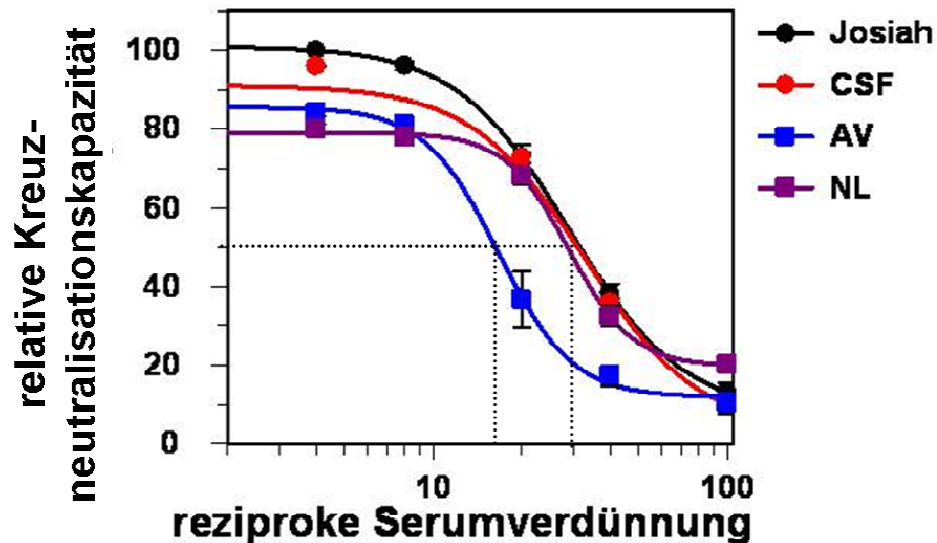


Abbildung 19: Titer der Kreuz-neutralisierenden Antikörper im Patientenserum III. Die pseudotypisierten LASV (Josiah, AV, NL, CSF-Stämme) und MLV Partikel (MOI 0,1) wurden mit verschiedenen Verdünnungen des Serums III eine Stunde bei RT inkubiert und zu den TE 671 (für LASV) bzw. L929 (für MLV) Zellen gegeben. Die Messung der GFP-Expression in den Zellen erfolgte 72 Stunden nach der Transfektion im FACS. Der Hintergrund ist subtrahiert.

Hierzu wurde zuerst eine scFv-Antikörperbank generiert, welche zur Selektion Virus-spezifischer Antikörper eingesetzt wurde.

### 3.3. Erstellung einer Antikörperbibliothek

Die Produktion einer Antikörperbibliothek beginnt mit der Isolierung der Gesamt- bzw. mRNA aus den Lymphozyten eines Patienten, eines immunisierten Tieres oder auch eines gesunden Probanden (naive Bibliotheken). Diese wird anschließend in cDNA umgeschrieben. Danach erfolgt die Amplifikation der Antikörpergene mittels spezifischer Primer. Die Klonierung in einen Phagen Display Vektor geschieht in zwei Schritten, wobei das Genrepertoire der leichten Kette zuerst eingefügt wird. Im zweiten Schritt werden die Gene der schweren Ketten in den Vektor kloniert, da schwere Ketten durch ihre hoch variablen CDH3 Regionen mehr zur Diversität beitragen. Nach dem Klonieren werden die erzeugten Phagemide in die M13 Phagen verpackt.

#### 3.3.1. Gesamt-RNA Isolierung zur Erstellung einer scFv-Antikörperbank des Lassa Fieber Patienten

Zur Erstellung der scFv-Immunbibliothek wurde aus  $2 \times 10^7$  Lymphozyten, welche aus dem Blut des Patienten (Probe III) über einen Ficoll-Gradient aufgereinigt wurden, die gesamte RNA isoliert und mithilfe von SuperScript III in cDNA umgeschrieben. Zur Kontrolle der cDNA-Qualität wurde eine PCR mit universellen GAPDH Primern durchgeführt (Abb.: 20).



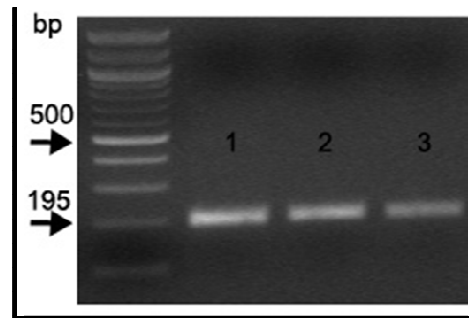


Abbildung 20: **Kontroll-PCR mit aus den Patienten-Lymphozyten gewonnener cDNA und GAPDH-Primern.** Zu den 0,5 µg der jeweiligen cDNA-Proben wurden 1 µl des spezifischen Primers (10 µM) hinzugefügt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Proben bei 100 V und 400 mA in einem 1%igen Agarosegel erfolgte eine Visualisierung mithilfe des Gel-Doc Imaging Systems.

Die DNA-Fragmente im Gel waren 200 Basen groß und entsprachen somit den Erwartungen. Keine weitere Bande war auf dem Gel vorhanden, was darauf hinweist, dass die cDNA nicht degradiert war und zur Erstellung der Bibliothek verwendet werden konnte.

### **3.3.2. Amplifikation der Antikörpergene für die Herstellung der scFv-Immunbibliothek**

Der erste Schritt zur Bibliothekerstellung bestand darin, die cDNA mithilfe von degenerierten Primern zu amplifizieren. Um die Fehler in einzelnen Sequenzen zu minimieren, wurde die PCR in zwei Schritten durchgeführt. Der erste sollte eine Genamplifikation gewährleisten, während die für die Klonierung in einen Vektor notwendigen Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen im zweiten Schritt eingefügt wurden.

Bei den Primern handelte es sich um ein Set aus 27 Oligonukleotiden, welche in drei Antikörperfamilien VH (9 Primer), VL $\kappa$  (7 Primer) und VL $\lambda$  (11 Primer) unterteilt waren (AG Dübel, TU Braunschweig). Das Besondere an diesen Primern war, dass sie eine Mischung von verschiedenen Basen an einer Position aufwiesen und somit die genetische Diversität der konstanten Bereiche von den variablen leichten bzw. schweren Ketten abdeckten.

Die 15 µg cDNA gemischt mit RedTaq Polymerase, 10x Puffer, NTPs und ddH<sub>2</sub>O wurde auf 27 Röhrchen (200 µL) verteilt und die subfamilienspezifischen Primer wurden hinzugefügt. Die erwarteten Fragmentgrößen lagen bei 450 bp für VH Gene und 650 bp für VL $\kappa$  und VL $\lambda$ . Die weiteren unspezifischen Signale auf dem Gel entstanden durch die unspezifische Bindung der Primer an das DNA-Template (Abb.: 21).

Anschließend wurden die DNA-Fragmente ausgeschnitten und die jeweiligen Antikörperfamilien zusammengefügt. Nach der Elution aus dem Gel wurden die DNA-Fragmente über eine Säule aufgereinigt. Dieses DNA-Gemisch diente als Template für die nächste PCR.

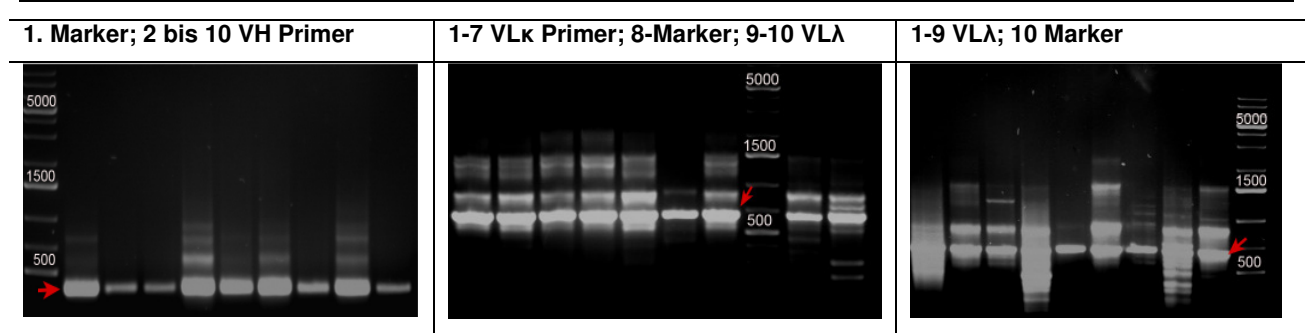


Abbildung 21: **Amplifikation der Antikörperketten für die scFv-Bibliothek I.** 15 µg cDNA in einem Amplifikationsansatz wurden auf 27 Röhrchen verteilt und mit jeweils 1 µL des spezifischen Primers (10 µM) versetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der einzelnen PCR-Ansätze bei 100 V und 400 mA in einem 1%igen Agarosegel erfolgte eine Visualisierung mithilfe des Gel-Doc imaging Systems.

Wie bereits erwähnt, sollten in dieser PCR die Schnittstellen für die Endonukleasen *NcoI* und *HindIII* (VH-Kette) sowie *MLuI* und *NotI* (VL-Kette) eingefügt werden. Das Set bestand gleicherweise aus 27 Primern, welche an weiter innen liegende Sequenzbereiche binden, so dass ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert wurde, welches nur die variablen Regionen der Antikörperketten kodierte (Abb.: 22).

Die Fragmentgrößen der variablen leichten sowie schweren Ketten betrugen ca. 400 bp. Auch nach der zweiten PCR waren im Gel weitere unspezifische DNA-Fragmente zu erkennen, welche wie in der ersten PCR durch unspezifisches Andocken der Primer an die DNA zu erklären sind.

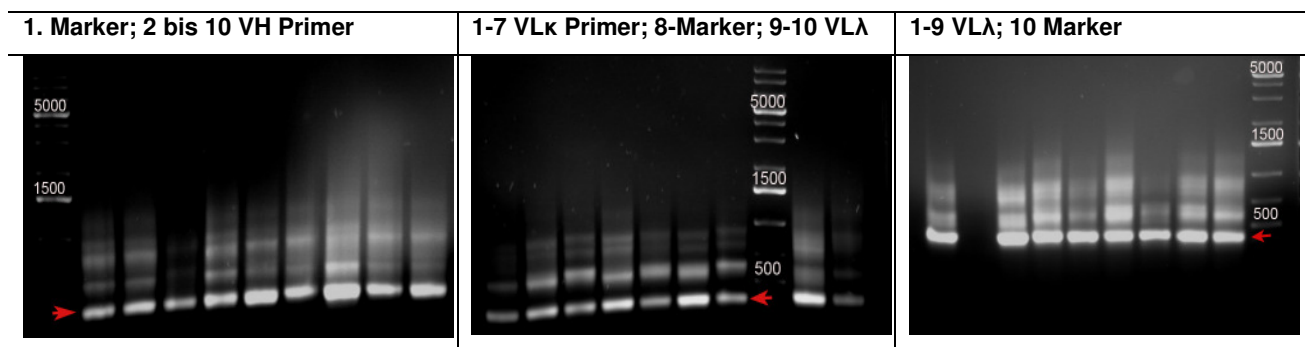


Abbildung 22: **Amplifikation der Antikörperketten für die scFv-Bibliothek II.** DNA aus dem ersten Schritt wurde zusammen mit einem Amplifikationsansatz auf 27 Röhrchen verteilt und dazu jeweils 0,4 µM des spezifischen Primers hinzugefügt. Visualisierung erfolgte bei 100 V und 400 mA in einem 1,5%igen Agarosegel.

Die DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in den Antikörperfamilien entsprechend vereint und aufgereinigt.

### 3.3.3. Klonierung der Antikörpergene in pHAL14 Vektor

Die Herstellung der Bibliothek basierte auf einem von Herrn Dr. M. Hust entwickelten pHAL 14 Vektor (Hust and Dubel 2005). Der Vektor gehört zu einer für die Produktion von scFv- sowie Fab-Fragmenten entwickelten pHAL-Vektorserie, welche vom pSEX81 Vektor (Welschof,

Terness et al. 1997) abgeleitet ist. Der pHAL 14 Vektor weist eine scFv-Klonierungskassette inklusive der vier Restriktionsschnittstellen sowie einen Protease-resistenten Linker auf, welcher aus der Aminosäuresequenz (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> besteht. Die scFv spezifischen Gene stehen unter der Kontrolle eines *lac*-Promoters, der in Gegenwart von Glukose in bestimmten *E. coli*-Stämmen reprimiert wird. Diese Gene werden in diesem Vektor an den C-Terminus der Signalsequenz der Pektatlyase aus *E. carotova* (Pel B) fusioniert, welche die periplasmatische Proteinexpression in *E. coli* ermöglicht. Am C-Terminus sind ein *c-myc*/9E10-*Tag* (N'-EQKLISEEDL-C') sowie ein (His)<sub>5</sub>-*Tag* eingefügt, welche zur Aufreinigung und zum Nachweis dienen. Des Weiteren befinden sich am C-Terminus über das *amber*-Stop-Kodon (UAG) verbunden das Gen für das (minor) Hüllprotein pIII. Die eingefügte Resistenz gegen Ampicillin erlaubt eine Selektion von transformierten Zellen. Außerdem verfügt der Vektor über zwei Replikationsursprünge, welche es ermöglichen, das fertige Konstrukt zum einen als einzelsträngiges Phagengenom im Phagen (M13 ori) und zum anderen als doppelsträngiges Plasmid in einer bakteriellen Wirtszelle (*colE1* ori) zu erhalten (Abb.: 23).

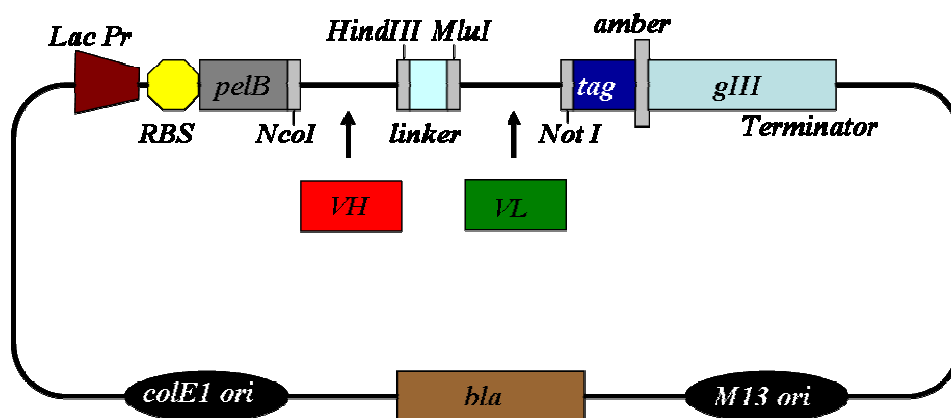


Abbildung 23: **Schema des pHAL 14 Vektors.** Rot markiert ist die Klonierungskassette mit den vier Restriktionsschnittstellen für scFv-Fragmente; am N-Terminus befindet sich der *lac*-Promotor sowie die Signalsequenz für die periplasmatische Proteinexpression; am C-Terminus sind *myc*- und (His)<sub>5</sub> Tags sowie die Gene für das Fusionsprotein pIII lokalisiert; *colE1* ori und *M13* ori stehen für zwei Replikationsursprünge.

Dieses Hybridsystem vereint die Vorteile eines Plasmids und eines Phagen und nennt sich daher Phagemid. Obwohl der Vektor den M13 Replikationsursprung aufweist, werden keine vollständigen Partikel produziert, da außer *gIII* keine weiteren Phagengene im Vektor vorhanden sind. Daher werden die mit Phagemid transformierten Bakterien zusätzlich mit M13K07 Helferphagen infiziert, welche eine Mutation Met40Ile in pIII sowie eine Kanamycin Resistenz Gen Tn903 aufweisen. M13K07 ist zwar in der Lage, in Abwesenheit von Phagemid DNA zu replizieren, in dessen Vorhandensein aber werden bevorzugt einzelsträngige Phagemide repliziert und verpackt. Die Klonierung der DNA-Fragmente in den Vektor erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde die Vektor-DNA sowie die DNA der leichten Kette mit *MluI* und *NotI* verdaut, ligiert und in den *E. coli* Bakterien Stamm XL1-Blue mittels Elektroporation eingefügt. Dieser Stamm zeichnet sich durch seine *lac<sup>q</sup>*-Mutation aus, welche eine

Überexpression des *lac*-Repressors bedingt. Daher wurde zur dauerhaften Inaktivierung des *lac*-Operons 20 mM Glukose in das Inokulationsmedium und auf die Agarplatten zur Anzucht der Bakterien gegeben.

Zu beachten ist, dass die DNA für die beiden Isotypen der leichten Kette (VL  $\lambda$  und VL  $\kappa$ ) separat in den Vektor eingefügt wurde. Bei der Klonierung der schweren Kette wurden die beiden Zwischenkonstrukte mit VL  $\lambda$  und VL  $\kappa$  separat mit *Nco* I und *Hind* III verdaut. Hierbei war es wichtig, die Qualität des Restriktionsverdaus zu kontrollieren, da das Enzym *Hind* III die DNA erfahrungsgemäß nicht vollständig hydrolysierte, was allerdings in einem Doppelverdaus nicht ersichtlich wird.

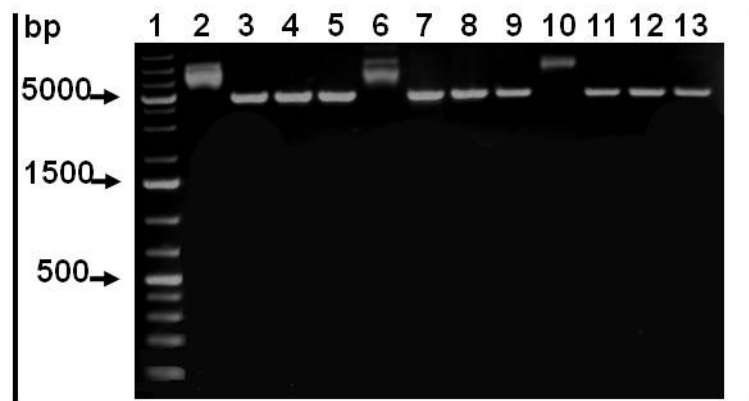


Abbildung 24: **Elektrophoretische Auftrennung des enzymatisch hydrolysierten Vektors aus dem ersten Klonierungsschritt.** DNA wurde verdaut, mit Probenpuffer versetzt und auf einem analytischen Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt. Spuren 1: 1 kb DNA-Marker von GeneRuler; 2: Konstrukt VL  $\kappa$  (erster Einsatz) unbehandelt; 3: Doppelverdaus des Konstruktes VL  $\kappa$  (erster Einsatz) mit *Nco* I und *Hind* III; 4: Verdau des Konstruktes VL  $\kappa$  mit *Nco* I (erster Einsatz); 5: Verdau des Konstruktes VL  $\kappa$  (erster Einsatz) mit *Hind* III; 6: Konstrukt VL  $\kappa$  (zweiter Einsatz) unbehandelt; 7: Doppelverdaus des Konstruktes VL  $\kappa$  (zweiter Einsatz) mit *Nco* I und *Hind* III; 8: Verdau des Konstruktes VL  $\kappa$  mit *Nco* I (zweiter Einsatz); 9: Verdau des Konstruktes VL  $\kappa$  (zweiter Einsatz) mit *Hind* III; 10: Konstrukt VL  $\lambda$  (erster Einsatz) unbehandelt; 11: Doppelverdaus des Konstruktes VL  $\lambda$  (erster Einsatz) mit *Nco* I und *Hind* III; 12: Verdau des Konstruktes VL  $\lambda$  mit *Nco* I (erster Einsatz); 13: Verdau des Konstruktes VL  $\lambda$  (erster Einsatz) mit *Hind* III.

Zu diesem Zweck wurden die Zwischenkonstrukte aus dem ersten Klonierungsschritt mit den einzelnen Enzymen sowie in einem Doppelansatz behandelt (Abb.: 24). Wie aus der Abbildung hervorgeht, wurden die beiden Zwischenkonstrukte mithilfe von Enzymen vollständig linearisiert und anschließend für die Ligation mit den DNA-Fragmenten der schweren Kette verwendet. Die fertigen Konstrukte wurden in die elektrokompenten XL1-Blue MRF<sup>+</sup> Bakterien mittels Elektroporation transferiert, wobei die  $\lambda$  und  $\kappa$  Ansätze separat behandelt wurden.

Um die Anzahl der transformierten Bakterien und somit die Diversität der erzeugten Bibliothek zu bestimmen, wurde für jedes Konstrukt eine Bakterien-Verdünnung von  $10^{-6}$  auf SOB-GA Agarplatten ausgestrichen. Die Diversität ergab sich aus der Anzahl der auf den Platten gewachsenen Klone multipliziert mit der Verdünnungsstufe und lag für die  $\lambda$  und  $\kappa$  Bibliotheken, welche nach beiden Isotypen der leichten Kette genannt waren, bei  $2 \times 10^7$ . Zur Anzucht der Antikörper-Banken wurden die Phagemid tragenden Bakterien mit M13K07 Phagen infiziert, die

über Nacht produzierten rekombinanten M13 Phagen gefällt und aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Titerbestimmung der beiden  $\lambda$  und  $\kappa$  Bibliotheken. Die Titer beliefen sich für  $\kappa$  auf  $2 \times 10^{11}$  und für  $\lambda$  auf  $1 \times 10^{12}$  Phagen pro mL.

### 3.3.4. Qualitätskontrolle der Bibliothek

Nach der Herstellung der Bibliothek sollte deren Qualität überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden achtzehn Klone gepickt, die scFv-Gene der jeweiligen Klone in einer Kolonie PCR amplifiziert und anschließend die Produkte im einem Agarosegel analysiert (Abb.: 25).

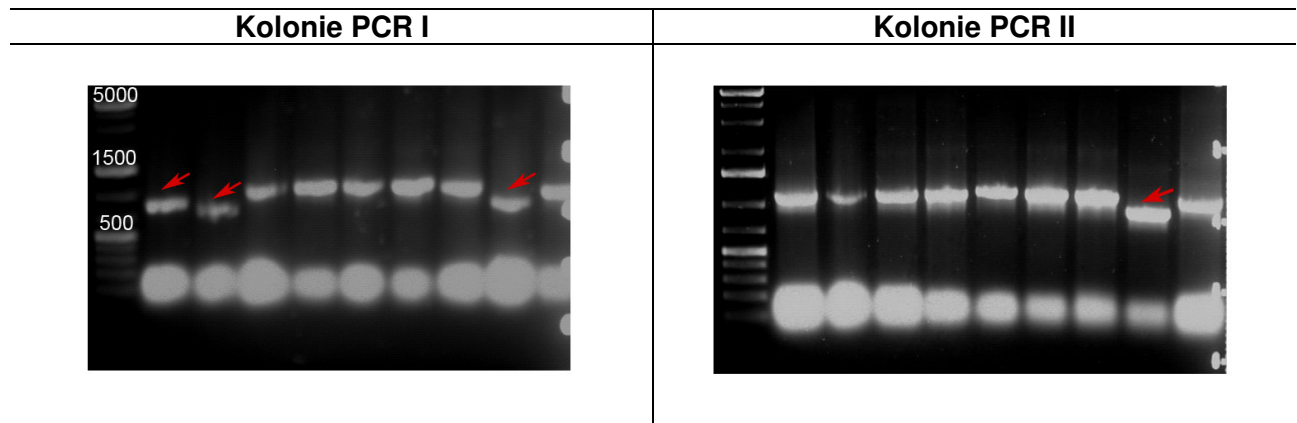


Abbildung 25: **Qualitätskontrolle der hergestellten Bibliothek mittels PCR.** 18 E. coli Kolonien wurden gepickt und für Kolonie-PCR eingesetzt. Primer: MHLacZ-Pro-forward und MHgIII-reverse; PCR-Produkte wurden im analytischen Agarosegel (1%) visualisiert. 1 kb Marker von GeneRuler; rote Pfeile zeigen Konstrukte, welche kleiner als 1100 bp waren.

Die Größe des amplifizierten Inserts sollte bei ca. 1100 bp liegen. Alle achtzehn Klone wiesen das Produkt auf, wobei auffallend war, dass die Produkte der vier mit roten Pfeilen markierten Klone (Abb.: 25) kleiner ausfielen und ca. 800 bp groß waren. Diese Unterschiede sind auf die zwischen 6 und 78 variierende Aminosäureanzahl in den CD3 Regionen zurückzuführen.

Im weiteren Verlauf sollten die scFv-Antikörperfragmente als Anteil des Fusionsproteins scFv::pIII im Western Blot detektiert werden. Hierfür wurden 2  $\mu$ L und 5  $\mu$ L von der  $\lambda$  sowie 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L und 10  $\mu$ L von der  $\kappa$  Bibliotheken mit  $\beta$  Mercaptoethanol-Probenpuffer versetzt, denaturiert und in einem 10% SDS-Gel entsprechend ihrer apparenten Größe aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden zwei in der Gruppe von Prof. Dübel (TU Braunschweig) hergestellte native HAL4 und HAL7 Bibliotheken verwendet. Nach dem Blotten wurden die Proteine in einer Immunofärbung mittels eines anti pIII Antikörpers visualisiert.

Obwohl die berechnete, theoretische Molekularmasse des pIII Proteins ohne scFv-Fragmente ca. 42,5 kDa beträgt, wurden diese Proteine bei 62 kDa nachgewiesen (Abb.: 26). Das abweichende Migrationsverhalten wurde bereits in anderen Arbeiten (Goldsmith and Konigsberg 1977; Gray, Brown et al. 1981; Breitling, Dubel et al. 1991) beschrieben und konnte bis jetzt nicht aufgeklärt werden. Entsprechend höher als erwartet, bei ca. 100 kDa und in Form einer Doppelbande wurden die scFv::pIII Fusionsproteine detektiert.

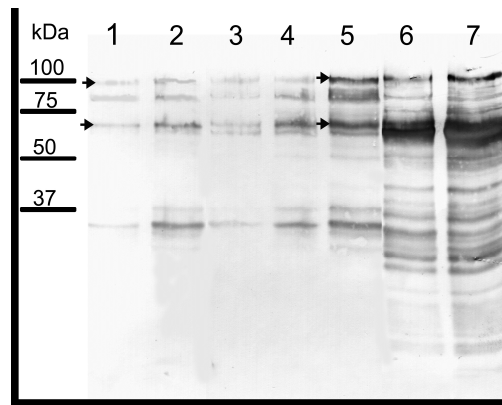


Abbildung 26: **Detektion der scFv::pIII Fusionsproteine.** Verschiedene Mengen der jeweiligen Bibliotheken wurden mit  $\beta$ -Mercaptoethanol-Probenpuffer versetzt, denaturiert und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten erfolgte die Detektion der Fusionsproteine mit einem monoklonalen anti pIII AK aus Maus (1:2000) und einem anti-Maus-AP-AK (1:10000). Zur Visualisierung wurde NBT und BCIP verwendet. Pfeile bei 100 kDa markieren die scFv::pIII Fusionsproteine und unterhalb von 75kDa – pIII Proteine ohne scFv-Fragmente. Die aufgetragenen Mengen der jeweiligen Bibliotheken: **1:** 2  $\mu$ L  $\lambda$ ; **2:** 5  $\mu$ L  $\lambda$ ; **3:** 2  $\mu$ L  $\kappa$ ; **4:** 5  $\mu$ L  $\kappa$ ; **5:** 10  $\mu$ L  $\kappa$ ; **6:** 1  $\mu$ L Kontrollbibliothek HAL 4; **7:** 1  $\mu$ L Kontrollbibliothek HAL 7. Proteinmarker: Precision Plus Protein Standard/DualColor von BioRad.

Obwohl die Mehrzahl der reifen Phagen nur eine Kopie des scFv::pIII Fusionsproteins und zwei bzw. vier Kopien von nativen pIII Proteinen trägt, sind die Signale von nativen pIII und scFv::pIII im Gel bei den beiden Immunbibliotheken gleich stark, was auf das Vorhandensein von multiplen Kopien der Fusionsproteine auf der Phagenoberfläche hindeutet.

Vergleicht man im Gel die Signalstärken von  $\lambda$  bzw.  $\kappa$  mit denen von HAL 4 und 7 Bibliotheken, stellt man fest, dass die Signale von beiden Immunbibliotheken wesentlich schwächer sind. Allerdings lag der Titer der naiven Bibliotheken bei  $10^{13}$  Phagen pro mL und war somit um mehr als eine *log*-Stufe höher als jener der  $\lambda$  bzw.  $\kappa$  Bibliotheken. Bei einer wiederholten Verpackung der Immunbibliotheken konnte kein verbesserter Titer erreicht werden, was möglicherweise auf die in den Phagemiden verpackten Gene zurückzuführen ist. Die weiteren detektierten Signale im Gel sind auf die durch die Denaturierung der pIII sowie scFv::pIII Proteine und dadurch entstandene Fragmente zurückzuführen.

### 3.4. Herstellung der Zielstrukturen für Biopanning

Erfahrungsgemäß trägt die richtige Auswahl des Targets für das Biopanning entscheidend zur erfolgreichen Selektion der spezifisch bindenden Liganden bei. Lassa Viren können wegen ihrer hohen Pathogenität und Ansteckungsgefahr für den Selektionsprozess nicht verwendet werden, denn die LASV werden nur unter den höchsten biologischen Sicherheitsbedingungen (BSL-4) kultiviert. Auch die Handhabung der einzelnen viralen Proteine erfolgt nur unter speziellen Schutzmaßnahmen. Um diese Problematik zu umgehen, wurden im Laufe dieser Doktorarbeit zwei Strategien entwickelt. Zum einen sollten pseudotypisierte virale Partikel hergestellt werden, wobei man unter Pseudotypisierung den Austausch der viralen Hüllproteine gegen die eines anderen Virus versteht. Es entstehen virale Partikel mit den Eigenschaften des heterologen

Hüllproteins bezogen auf Tropismus und Antikörperbindung. Zusätzlich sind solche Partikel replikationsunfähig und tragen nur ein Transgen. Somit kann eine solche Virusproduktion in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 erfolgen.

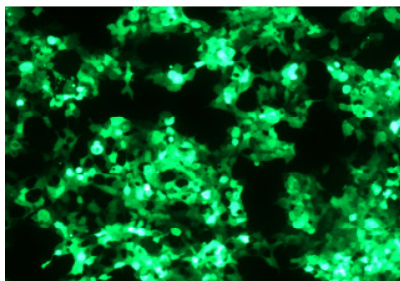
Zum anderen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Kunz (Institut der Mikrobiologie, Lausanne, Schweiz) zwei Konstrukte hergestellt, welche die Gene für Lassa GP1 sowie als Proteinmarker *HA*-, *Flag*- und *Fc* –Fragmente für Detektion und Aufreinigung enthalten. Nach dem Einbringen der Plasmide in HEK 293H Zellen werden diese das lösliche Glycoprotein 1 exprimieren, welches in den Überstand freigesetzt wird.

### **3.4.1. Herstellung viraler pseudotypisierter Partikel**

Die Fähigkeit von Retroviren in der Zellkultur ohne das analoge Hüllprotein eine Knospung zu induzieren, wurde in dieser Arbeit verwendet, um virale Partikel mit veränderten Oberflächeneigenschaften zu produzieren.

Mittels lentiviraler sowie retroviraler Transfektion von 293T Zellen wurden mehrere pseudotypisierte Viruspartikel hergestellt, welche als Target für positive bzw. negative Selektion dienen sollten. Unter anderem wurden Pseudotypen vom Vesicular stomatitis Virus (VSV), Humanem Immundefizienz Virus (HIV-1, JR-FL Stamm), Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV), Influenza Virus (H5N1), Hepatitis C Virus (HCV), Maus-Leukämie-Virus (MLV) und Lassa Fieber Virus (LASV, Josiah, AV, NL, CSF Stämme) erzeugt. Die Zusammensetzung des jeweiligen Transfektionssets ist in Tabelle 12 dargestellt. Die Plasmide wurden von der Arbeitsgruppe von Laer zur Verfügung gestellt sowie von Dr. T. Haarmann (AG Dietrich) generiert (Influenzahüllprotein). Das große „M“ in den Plasmidnamen bezieht sich auf eine interne Nummerierung der Konstrukte.

Die Titerbestimmung der produzierten viralen Partikel erfolgte über Transduktion der entsprechenden Zelllinien, welche in der Integration des Transgens (GFP) in das Wirtsgenom und Expression des Markerproteins resultierte. Die grün fluoreszierenden Zellen wurden mit Mikroskop und Durchflusszytometer detektiert (Abb.: 27).



**Abbildung 27: Aufnahme von grün fluoreszierenden 293T Zellen 72 h nach Transfektion mit M56a, M579, M118 Plasmiden im Fluoreszenzmikroskop. Excitation bei 473 nm**

Durch den Vergleich der viralen Titer verschiedener Pseudopartikel sowie zweier verschiedener Verpackungssysteme (Tab.: 13) wurde die retrovirale MLV basierende Produktion von pseudotypisierten heterologen LASV sowie homologen MLV Partikeln bevorzugt.

Tabelle 13: **Die Zusammensetzung der Transfektionssets und der Vergleich der viralen Titer verschiedener Pseudopartikel aus retro- und lentiviralen Verpackungssystemen nach dem Aufkonzentrieren**

Virus	Transfektion	Titer	Gagpol	Hüllprotein	GFP
VSV	Lenti	$5 \times 10^6$	M334	M5	M420
HIV	Lenti	$5 \times 10^7$	M334	M118	M420
HCV	Lenti	$5 \times 10^6$	M334	M480	M420
LCMV	Lenti/γ-retro	$5 \times 10^6$	M334/ M579	M108	M420/M56a'
Influenza	Lenti/γ-retro	$5 \times 10^6 / 1 \times 10^7$	M334/ M579	HA/NA (M)	M420/M56a'
MLV	γ-retro	$5 \times 10^6$	M579	M187	M56a'
LASV	Lenti/γ-retro	$1 \times 10^8 / 2 \times 10^8$	M334/ M579	M188	M420/M56a'

Der Vorteil einer solchen einheitlichen Produktion lag darin, dass beide Pseudotypen unterschiedliche Virushüllen aufwiesen, während die darunter liegenden Matrix- und Kapsidproteine identisch waren. Somit konnten die optimalen Rahmenbedingungen für das nachfolgende Biopanning der Phagen Bibliothek gewährleistet werden. Der zweite Ansatz, lentiviral verpackte LASV und HIV herzustellen, erwies sich als kosten- und zeitaufwendig, da die kontinuierliche Produktion des für diese Transfektion benötigten *gag-pol* Plasmids (M334) in *E. coli* nicht gewährleistet werden konnte.

### 3.4.2. Sequenzalignment der Glykoproteinprecursor der LASV Stämme Josiah, AV, CSF, NL

Das Sequenzalignment der *gpc* Gene aus vier verschiedenen Lassa Fieber Virusstämmen sollte im späteren Verlauf der Arbeit eine Aussage über die kreuzneutralisierenden Eigenschaften der selektierten Klone ermöglichen (Abb.: 28).

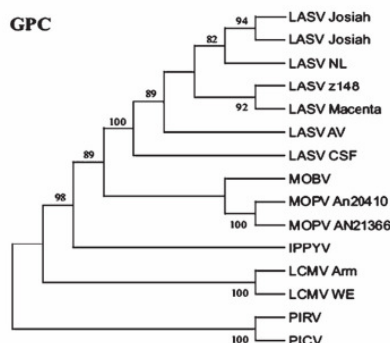


Abbildung 28: **Phylogenie von Alt-Welt Arenaviren basierend auf der Analyse der kompletten GPC Gene (Emonet, Lemasson et al. 2006).** Die verwendeten Sequenzen stammen aus der GenBank des NCBI.

Vergleicht man die Sequenzen der GPC Gene der vier Lassa Viren, stellt man fest, dass den 1473 nt langen GPC Genen des CSF im Gegensatz zu Lassa Josiah und NL ein Kodon (eine AS) in der GP1 Region fehlt (Abb.: 29).



Abbildung 29: **Sequenzalignment der Glykoproteine der Lassa Fieber Virusstämme Josiah, AV, CSF, NL.** **Rot:** S1P Schnittstelle sowie GP2 Fusionspeptid; **grün:** Lassa Fieber Virus CTL Epitop in GP2 Region; **braun:** Glykosylierungsstellen; \* übereinstimmende AS.

Bei drei von vier Stämmen konnten elf hoch konservierte Glykosylierungsstellen mithilfe des Programms NetNGly identifiziert werden (7 in GP1 und 4 in GP2, braun markiert in der Abb. 29), wobei bei der Asparagin-verknüpften Glykosylierung innerhalb des ER die Aminosäuresequenz Asparagin-X-Serin/Threonin erkannt wird. Bei diesem Motiv darf X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein. Der GPC der Lassa AV zeigt eine zusätzliche Glykosylierungsstelle. Auch die Regionen um die GP1-GP2 Schnittstelle sowie die GP2 Fusionsprotein-Sequenz sind auf der Proteinebene komplett identisch (rot markiert).

Alle vier Virusstämme weisen eine weitere konservierte Stelle auf (grün markiert), bei welcher es sich um einen Lassa Fieber Virus CTL Epitop handelt (Boesen, Sundar et al. 2005).

Differenzen in den einzelnen Sequenzen wurden mittels NCBI Blast Align ermittelt. Die höchste Variabilität zeigen erwartungsgemäß die GP1 Regionen, die GP2 Sequenzen weisen hingegen größere konservierte Bereiche auf, die in fast allen bekannten Alt-Arenaviren vorzufinden sind.

Der Ähnlichkeitsgrad zwischen Josiah und NL GPC Aminosäuresequenzen lag bei 94%, während dieser zwischen Josiah und AV bzw. CSF entsprechend 84% und 81% beträgt. Innerhalb der AS-Sequenzen konnten bei allen 4 Proteinen keine wie bei HIV klar definierten variablen bzw. konstanten Bereiche identifiziert werden, was die Aussage über die möglichen Epitope erschwerte.

Als nächstes wurde ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der LASV Josiah und Machupo Stämme durchgeführt (Abb.: 30).

Josiah	MGQIVTFFQEVPHVIEEVMNIVLIALSVLAVLKGLYNFATCGLVGLVTFLLLCGRSCTTS	60
Machupo	MGQLISFFQEI PVFLQEALNIALVAVSLIAVIKGI INLYKSGLFQFIFL LLAGRSCSDG	60
	***:::***:* .::*::**.*::***::**:* * : .***. : : ****.***: .	
Josiah	LYKG--VYELQTELELNMETLNMT---MPLSCTKNNSHHYIMVGNETGLELTLTNTSIIN	114
Machupo	TFKIGLHTEFQSVTLTMQRLLANHSNELPSLCMLNNSFYMKGGVNTFLIRVSDISVLMK	120
	:* *::: *.*: * . : * * ***.:*: * : * * . : :::	
Josiah	HKFCNLSDAHKKNLYDHALMSIISTFHLSIPN---FNQYEAMSCDFNGGKISVQYNLSHS	171
Machupo	EHDVSIYEPEDLGNCLNKS DSSWA IHWFSNALGHDWLM DPPMLCRNKTKEGSNIQFNIS	180
	:: : : . . . : * : . : * . : . * * : * . : : . *	
Josiah	YAGDAANHCGTVANGVLQTFMRMAWGGSYIALDSGRGNWDCIMTSYQYLI IQNTTWEDHC	231
Machupo	KADDVRVYGKKIRNG-----MRHLFRGFHDPC EEGK-KCYLTINQCGDPSSF DYCGMDHL	234
	*.*. : . : ** ** : * : . : .*: : : . . : **	
Josiah	QFSRFPSPIGYLGLLSORTRDIYISRRLLGTFWTLS DSEGKDTPGGYCLTRWMLIEAELK	291
Machupo	SKCQFDHVNTLHFLVRSKTHLNFRSLKAPFSWSLTDSSGKDMPGGYCLEEWMLIAAKMK	294
	. . : . . * : * : . . : . * * . * : * : * . *** ***** .*** *:::	
Josiah	CFGNTAVAKCNEKHDEEFC DMLR LFD FNKQAIQRLKAEAQMSIQLINKAVNALINDQLIM	351
Machupo	CFGNTAKEIN-----LLSQTVNALISDNLLM	320
	***** *: : : *****.*:*:	
Josiah	KNHLRDIMGIPYCNYSKYWYLNHTTTGRTSLPKCWLVSNGSYLNETHFSDDIEQQADNMI	411
Machupo	KNKIKELMSIPYCN YTKFWYVNHTLTGQHTLPRCWLIRNGSYLNTSEFRNDWILES DHLI	380
	**::: : *.*****:*:*:* ** : : **:*: ***** :.* : * : : : *	
Josiah	TEMLQKEYMERQGKTPLGLVDL FVFSTSFYLISIFLHLVKIPTHRHI VGKSCPKPHRLNH	471
Machupo	SEMLSKEYAEROGKTPITLVDICFWSTVFF TASLFLHLVGIPTHRHLKGEACPLPHKLDS	440
	:***.*** *****: ***: .:*** *: *:***** *****: *:*** **:*:	
Josiah	MGICSCGLYKQPGVPVKWKR--	491
Machupo	FGGCRGKYPRLRKPTIWHKRH	462
	:* * * * : * . *:::	

Abbildung 30: Sequenzalignment der Glykoproteine der Lassa Fieber Virusstämme Josiah und Machupo. Rot: S1P Schnittstelle sowie GP2 Fusionsprotein; grün: Lassa Fieber VirusCTL Epitop in der GP2 Region; braun: Glykosylierungsstellen von Josiah; blau: Glykosylierungsstellen von Machupo; \* übereinstimmende AS.

Das Machupo Virus ist ein Vertreter der Neu-Welt Arenaviren und verursacht das bolivianische hämorrhagische Fieber. Durch das Aligment des Josiah-Hüllproteins mit dem GPC von Machupo,

dessen GP1 Kristallstruktur bereits aufgeklärt ist, konnten keine Rückschlüsse über potentielle antigene Determinanten getroffen werden (Abb.: 30). Die GP1 Regionen wiesen nur sehr wenige konservierte Bereiche auf, und auch die Anzahl sowie Lokalisation von Glykosylierungsstellen unterschieden sich essenziell. Hingegen zeigten die GP2 Bereiche eine größere Übereinstimmung, wobei die S1P Schnittstelle bis zu 80% konserviert ist.

Obwohl die Kongruenz der Sequenzen unter vier Alt-Welt Arenaviren bei 94% liegt, können die Abweichungen in einzelnen Aminosäuren dazu führen, dass sich das Bindungs- und Neutralisationsverhalten der Antikörper in Bezug auf die vier Lassa Stämme maßgeblich unterscheidet, da die GPC-Epitope dieser Viren bis dato noch nicht aufgeklärt sind. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit die verschiedenen Glykoproteine für die nachfolgenden Kreuzneutralisationsassays verwendet werden.

### **3.4.3. Klonieren von Lassa NL-, AV-, CSF -GP sowie Z-Protein in M288 Expressionsvektor**

Um die kreuzneutralisierenden Eigenschaften des Patientensserums sowie der aus dem Screening isolierten spezifischen scFv-Fragmente zu analysieren, wurden weitere Pseudopartikel mit verschiedenen LASV-GP auf der Oberfläche hergestellt. Dabei wurden die aus dem vorliegenden DNA-Material von Lassa-Stämmen NL, AV und CSF (zur Verfügung gestellt von Herrn. Dr. S. Günther) amplifizierten Sequenzen für Glykoproteine mithilfe des Original TA Cloning Kits und spezifischen Primern in den Klonierungsvektor PCR 2.1 subkloniert, wobei zwei Schnittstellen für die Enzyme *Xho* 1 und *Bam*H 1 eingefügt worden sind. Nach dem erfolgreichen Klonieren und der nachfolgenden Transformation der Top 10 Bakterien wurden aus verschiedenen Subklonen die Plasmide isoliert, mit Endonukleasen verdaut und auf Agarosegelen analysiert. Anschließend wurde die korrekte Basenabfolge der einzelnen Klone durch Sequenzierung verifiziert.

In einem weiteren Schritt wurden die isolierten und aufgereinigten DNA-Abschnitte in den Expressionsvektor M288 eingefügt, wobei es sich dabei um einen für die Transfektion von humanen Zellen geeigneten Vektor mit CMV-Promotor handelte.

Zur Kontrolle der Klonierung wurden Plasmide enzymatisch hydrolysiert und in einem analytischen Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt (Abb.: 31). Die Größe der Banden auf dem Agarosegel entsprach den Größen der eingefügten Inserts und lag erwartungsgemäß bei ca. 1,5 kb für die *gpc*-Gene aus Lassa AV, CSF und NL-Stämme. Bei den Fragmenten von ca. 5 kb handelte es sich um das Vektorrückgrat ohne Insert. Des Weiteren wurde ein Testverdau des von Prof. Dr. D. von Laer zur Verfügung gestellten Plasmids M188, welches *gpc*-Gene des Lassa Josiah Virus als Insert trägt, mit *Eco* RI durchgeführt. Da sich innerhalb des Inserts eine weitere Restriktionsschnittstelle für *Eco* RI befindet, wurden zwei Fragmente mit der Größe von 1000 und 500bp erwartet.

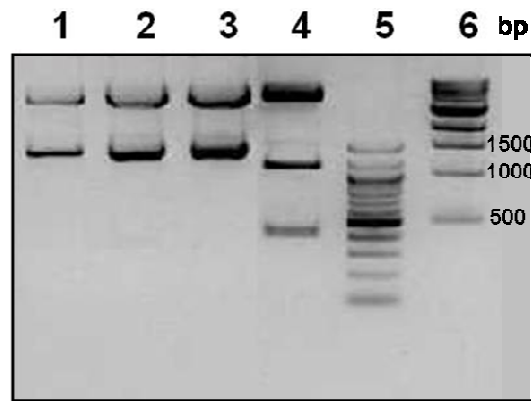


Abbildung 31: **Elektrophoretische Auftrennung der enzymatisch hydrolysierten Plasmid-DNA der viralen Lassa GPC.** 1 µg DNA wurde verdaut, mit Probenpuffer versetzt und im analytischen Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt. Spuren 1 bis 3: Doppelverdau mit XhoI und BamHI der *gpc* DNA von LASV AV, CSF, und NL-Stämmen. Spur 4: mit EcoRI verdaute *gpc* DNA des Josiah-Lassa Stamms. Spuren 5 und 6: Marker 100 bp (5) und 1 kbp (6) von NEB.

Das Restriktionsmuster fiel wie erwartet aus. Die klonierten Konstrukte wurden zur Herstellung verschiedener pseudotypisierter Lassa Fieber Viruspartikel eingesetzt.

Darüber hinaus wurde die DNA-Sequenz für das LASV NL Matrix Protein Z nach dem oben beschriebenen Schema über eine Subklonierung in den Vektor M288 kloniert, wobei auch in diesem Fall zwei Schnittstellen für die Enzyme *Xho* 1 und *Bam*H 1 mittels Primern eingefügt worden sind. Dieses Plasmid sollte in weiteren Versuchen zur Herstellung der pseudoviralen Partikel verwendet werden.

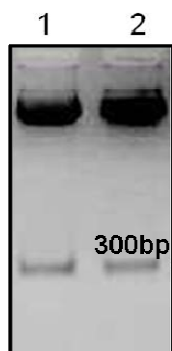


Abbildung 32: **Elektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNA des Z-Proteins.** 1 µg DNA wurde verdaut, mit Probenpuffer versetzt und bei 100 V und 400 A in einem analytischen Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt. Spuren 1 und 2: Doppelverdau mit XhoI und BamHI der *z* DNA (zwei positive Klone) aus NL-Lassa Stämmen.

Zur Kontrolle der Klonierung wurde das mit entsprechenden Enzymen geschnittene Konstrukt in 1%igen Agarosegel analysiert. (Abb.: 32). Das Insert bzw. das Vektorrückgrat wiesen eine Größe von 300 bp bzw. 5 kb auf.

#### 3.4.4. Einfluss des Lassa Z-Proteins auf den Titer der viralen Partikel

Um den Einfluss des Lassa Matrix-Proteins auf den Titer der viralen Lassapartikel zu untersuchen, wurden verschiedene Mengen des **Z** Konstrukts sowohl bei der γ-retro- als auch bei

der lentiviralen Produktion der Lassa-Pseudotypen eingesetzt (Tab.: 14). Dabei blieben die Transfektionsansätze gleich.

Tabelle 14: **Titer der viralen Partikel verpackt mit verschiedenen Mengen Plasmid-DNA des Z-Proteins**

Verpackung	Titer (Z in M288) 0 µg/ 5x10 <sup>6</sup> Zellen	Titer (Z in M288) 1 µg/ 5x10 <sup>6</sup> Zellen	Titer (Z in M288) 2 µg/ 5x10 <sup>6</sup> Zellen ohne M 579	Titer (Z in M288) 2 µg/ 5x10 <sup>6</sup> Zellen mit M579
Lenti	3x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>5</sup>
Retro	2x10 <sup>8</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>	8,4x10 <sup>5</sup>	4,8x10 <sup>5</sup>

Die Zugabe des **z** Konstruktes zu dem Transfektionsansatz bei der Virusproduktion bewirkte keine Erhöhung des viralen Titers (Tabelle 13). Stattdessen führte die Expression des Z Proteins zum Zelltod und dem darauf folgenden Ablösen der Zellen von den Platten (Abb.: 33).

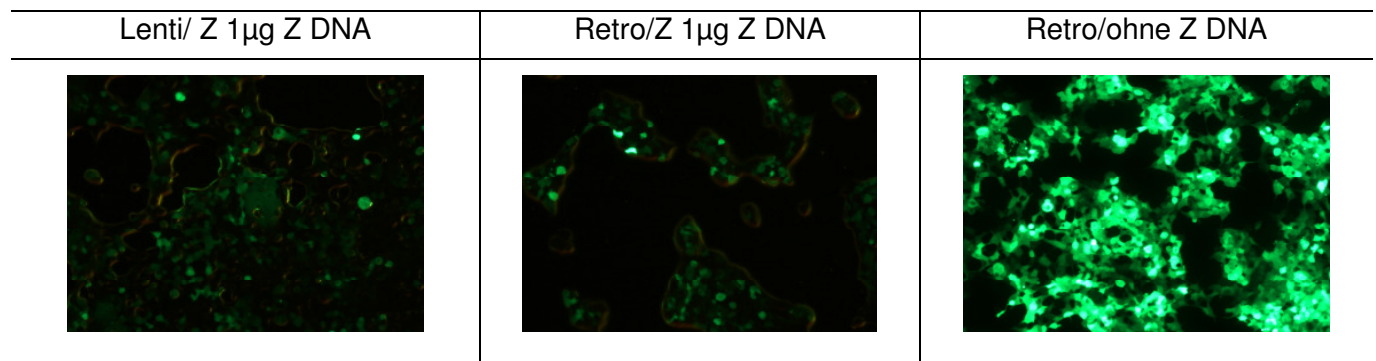


Abbildung 33: **Aufnahme von grün fluoreszierenden 293T Zellen 48 h nach retro- bzw. lentiviralen Transfektion** mit *gagpol*, *gfp*, *LASV-gpc* Plasmid-DNA sowie mit 1µg .Plasmid-DNA des Z-Proteins. Excitation bei 473 nm.

Bereits bei einer Plasmidmenge von 1µg fiel der Titer der Partikel im Vergleich zur positiven Kontrolle rapide ab und lag bei 10<sup>6</sup>. Es konnte eine Abhängigkeit zwischen der Zellvitalität und der Menge des transfizierten Konstrukts Z festgestellt werden (Bilder sind nicht gezeigt). Die mit 2 µg des Plasmids transfizierten Zellen bildeten keinen Rasen und hafteten nur einzeln auf der Platte.

In den von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Garten (Strecker, Eichler et al. 2003) durchgeführten Studien wurde demonstriert, dass in Abwesenheit von anderen viralen Lassa Proteinen das Z Protein in der Lage ist, so genannte *virus-like* Partikel zu bilden und freizusetzen. Darüber hinaus können bei einer Koexpression das Matrixprotein Z und die Hüllproteine miteinander interagieren und in die *virus-like* Partikel integriert werden (Schlie, Maisa et al.). In diesem Zusammenhang und unter Berücksichtigung dessen, dass das Plasmid M579 bereits ein eigenes MLV-Matrixprotein in sich trägt, wurden in einem weiteren Versuch nur zwei virale Proteine GP und Z in den Zellen koexprimiert, wobei die GFP-Expression der Visualisierung der Zellen diente. Zu erwarten war der Rückgang des Zelltods, da nur die *virus-like* Partikel und keine

kompletten Viren gebildet werden sollten. Allerdings unabhängig von der Zusammensetzung des Transfektionseinsatzes starben die Zellen bereits nach 42 Stunden in Anwesenheit des Z-Proteins. Für die weiteren Produktionen von viralen Partikeln wurde daher das **Z** Konstrukt aus dem Transfektionsset herausgenommen.

### **3.4.5. Produktion von löslichen Delta33-GP1-Proteinen**

Da die Rezeptor-Bindungsstelle des GP1 das primäre Ziel für neutralisierende Antikörper darstellt, wurden für die Selektion von Antikörperbibliotheken zwei rekombinante GP1 generiert. Dabei war die für die Klonierung verwendete GP1 Sequenz anlehnend an die Arbeiten von Dr. T. Bowden und Dr. M. Illick am N-Terminus um 33 Aminosäuren verkürzt, wobei die SP-Sequenz für den endoplasmatischen Transport unverändert blieb (Illick, Branco et al. 2008; Bowden, Crispin et al. 2009). Dieser Schritt sollte die Expression sowie Freisetzung des Proteins erhöhen und die Ausbildung von Aggregaten vermindern. Zum Zweck der Markierung bzw. Aufreinigung wurde am N-Terminus der beiden Inserts ein HA-Tag eingefügt. An den C-Termini wurde entsprechend der humane Fc-Antikörperteil sowie ein Flag-Oktapeptid integriert. Die Schnittstelle für SKI-1/S1P, welche das Motiv RRLLDYKDD erkennt, wurde in RRAA mutiert.

Die Konstrukte wurden in den Vektor pcDNA3.1 int A+ kloniert, welcher eine vollständige direkt stromabwärts des CMV Promotors liegende 1,5 kbp CMV-MIE Intron A Sequenz enthält. Diese Sequenz erhöht wesentlich die intrazelluläre Expression von löslichen Hüllproteinen (Illick, Branco et al. 2008). Beide Plasmide wurden im *E. coli* Stamm DH5α produziert.

Für die Expression der löslichen Proteine wurden HEK 293H Zellen verwendet, welche in der Lage sind in FCS-freiem Medium zu wachsen. Der Vorteil einer solchen Zellkultivierung liegt darin, dass die aufwendigen Aufreinigungsschritte des produzierten Proteins von FCS Resten entfallen. Für eine bessere Anheftung und eine höhere Wachstumsrate der Zellen wurden diese zum einen mit DMEM-basierenden Panzerin 293 A Medium kultiviert, welches alle notwendigen Spurenelemente und Wachstumsfaktoren enthält. Zum anderen wurden die Petrischalen für die Anzucht der Zellen mit Poly-Lysin beschichtet. Die transiente Transfektion erfolgte mittels des CaCl<sub>2</sub> Kits der Firma Sigma, wobei 15 µg Plasmid-DNA auf 5x10<sup>6</sup> Zellen gegeben wurden. 32 bzw. 48 Stunden nach der Transfektion wurde der Überstand gesammelt und bei 2000 rpm zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Die Überstände wurden separat eingefroren. Anschließend wurden die löslichen HA-GP1-92-256RRAA-Flag bzw. HA-GP1-92-256RRAA-Fc aus dem zellulären Überstand mithilfe von Methanol/Chloroform extrahiert. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Immunfärbung erfolgte mit einem polyklonalen anti-Hemagglutinin Antikörper aus Kaninchen und einem mit APC gekoppelten anti-Kaninchen IgG.

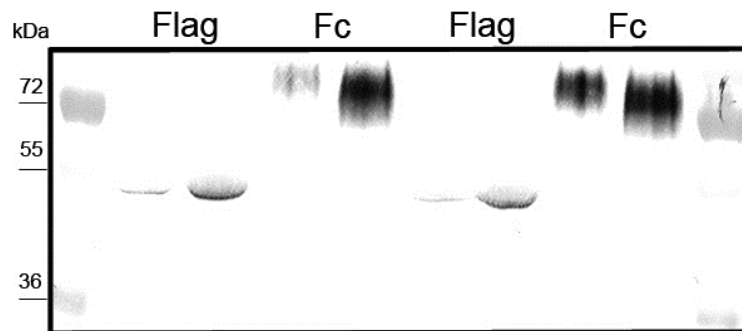


Abbildung 34: **Analyse der in HEK 293H exprimierten Glykoproteine 1 im Western Blot.** 50µL Probe wurden mit Probenpuffer versetzt, in einem 10% Gel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Proteine aus zwei verschiedenen Transfektionsansätzen wurden untersucht. Die Proteinernte erfolgte nach 32 und 48 Stunden, GP1 wurden mit Methanol/Chloroform aus Überständen extrahiert. Die Immunfärbung wurde mithilfe von polyklonalen anti-HA AK aus Kaninchen (1:100) und einem anti-Kaninchen-APC-AK (1:500) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte mit NBT/BCIP Lösung der Firma Roche.

Erwartungsgemäß lagen die Signale der HA-GP1-92-256RRAA-Flag Proteine bei ca. 40 kDa, während die Fc-tragenden GP1 eine Größe von 80 kDa aufwiesen. Obwohl keine quantitative Bestimmung vorliegt, ist in der Abbildung (Abb.: 34) deutlich zu erkennen, dass die zellulären Überstände, im Vergleich mit der nach 32 Stunden gesammelten Probe, nach 48 Stunden wesentlich mehr Protein enthalten. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die GP1 stets 48 Stunden nach Transfektion geerntet.

### ***3.5. Strategien zur Selektion der Antikörperfragmente***

Der Erfolg eines Biopanning hängt entscheidend von der Qualität sowie der Immobilisierung des Targets ab, welches zum Biopanning einer Phagen Bibliothek verwendet wird.

Im Laufe dieser Arbeit sollte ein System zur Selektion von scFv-Fragmenten gegen LASV entwickelt werden. In diesem Zusammenhang sind zwei verschiedene Wege eingeschlagen worden. Zum einen wurde das lösliche Lassa GP1 in humanen 293H Zellen produziert auf ELISA-Platten gebunden. Zum anderen wurden die viralen pseudotypisierten Partikel an verschiedene Träger immobilisiert. Als Träger für Viren kamen diverse magnetische Beads sowie ELISA Platten mit verschiedenen Oberflächeneigenschaften zum Einsatz.

Ein Problem bestand darin, dass im Moment keine monoklonalen, frei käuflichen Antikörper gegen LASV GPC zur Verfügung stehen, welche dem direkten Nachweis der viralen Bindung im ELISA- bzw. Durchflusszytometer-Experimenten dienen können. Daher wurde für die Immunfärbung der gebundenen Viren die Patientenseren II bis V verwendet.



### 3.5.1. Immobilisierung LASV-GPC-pseudotypisierter Viren auf magnetischen Beads

Bei magnetischen Beads handelt es sich um Nanokügelchen mit einheitlicher Größe, welche in einem starken Magnetfeld schnell sedimentieren. Sie unterscheiden sich je nach Hersteller in ihren Oberflächeneigenschaften. Die ersten Beads, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, stammen von der Firma Ademtech und zeichnen sich durch eine anionische, mit dem Polymer Poly(Methyl-Vinyl-Ether- Maleinsäureanhydrid) beschichtete Oberfläche aus. Die Kopplung von  $1 \times 10^7$  viralen Lassapartikeln an die Beads erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach den Wasch- und Blockschritten wurden die Nanopartikel mit Serum II und PE gekoppelten anti-humanen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Als Negativkontrolle dienten die Beads, welche ausschließlich mit Serum II und PE gekoppelten anti-humanen Antikörpern inkubiert wurden (Abb.: 35). Wie aus dem Histogramm hervorgeht, lag die Fluoreszenzintensität der gebundenen Influenzapartikel bei ca. 40%. Das relativ kleine Signal konnte darauf zurückgeführt werden, dass mit  $1 \times 10^5$  Partikeln keine Sättigung der magnetischen Beads erzielt wurde. Dennoch konnten die Influenza Viren auf den magnetischen Trägern immobilisiert werden.

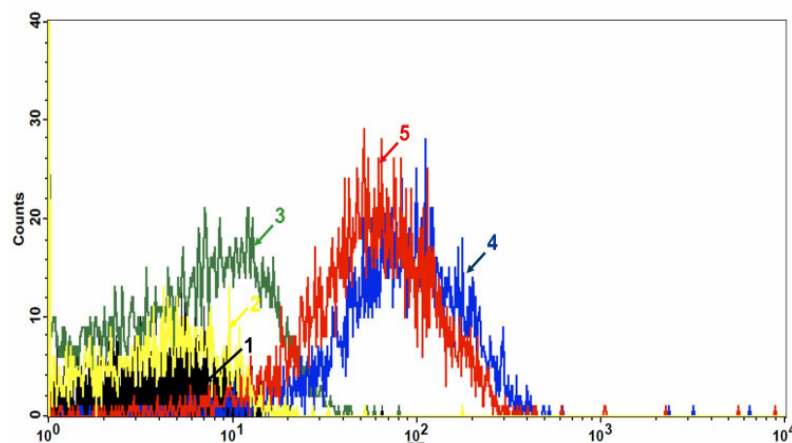


Abbildung 35: **Immobilisieren von pseudotypisierten LASV auf Viro-Ademtech Beads.** 10 µL Viro-Ademtech Beads wurden mit  $1 \times 10^7$  pseudotypisierten LASV bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Der Nachweis der Virusbindung erfolgte mit Serum II (1:200) und PE gekoppelten anti-hum AK (1:25) im Durchflusszytometer. Proben: **1** Beads (**schwarz**); **2** Beads mit anti-hum-PE AK (**gelb**); **3** LASV Partikel gekoppelt an die Beads und gefärbt mit anti-hum-PE AK (**grün**); **4** Beads gefärbt mit Serum II und anti-hum-PE AK (**blau**); **5** LASV Partikel gekoppelt an die Beads und nachgewiesen mit Serum II und anti-hum-PE AK (**rot**); die Ordinate gibt die Anzahl der Events an; die Abszisse zeigt die Fluoreszenzintensität.

Trotz Blocken (5% BSA in PBS) der freien Bindungsstellen der Beads hat das Serum unspezifisch an die Träger gebunden, wodurch die Differenzierung zwischen den einzelnen Proben mit und ohne virale Partikel nicht möglich war. Um die Immobilisierungsmethode der Viren zu überprüfen, wurden  $1 \times 10^5$  Influenza Pseudoviren auf die gleiche Weise an die Beads gekoppelt. Der Nachweis erfolgte mit monoklonalen anti-Hämagglutinin und PE gekoppelten anti-Kaninchen Antikörpern (Abb.: 36).



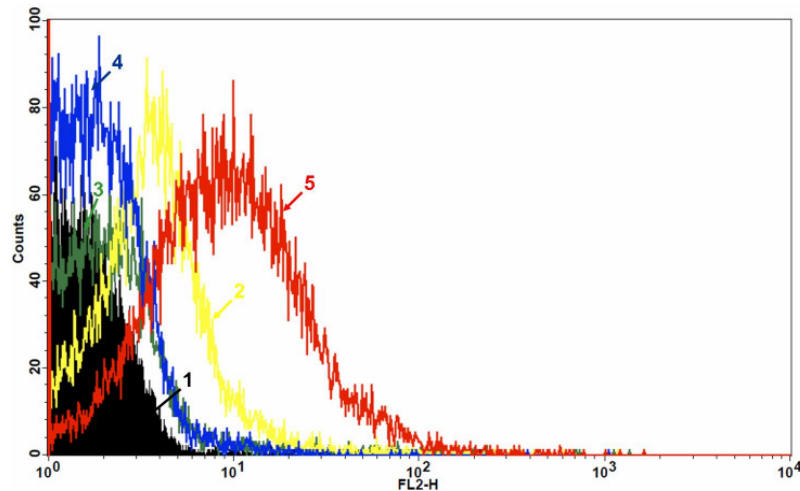


Abbildung 36: **Immobilisieren von pseudotypisierten Influenza Viren auf Viro-Ademtech Beads.** 10  $\mu$ L Viro-Ademtech Beads wurden mit  $1 \times 10^5$  pseudotypisierten Influenza Viren bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Der Nachweis der Virusbindung erfolgte mit monoklonalen anti-HA AK aus Kaninchen (1:100) und anti-Kaninchen-PE AK (1:200) im Durchflusszytometer. Proben: **1**: Beads (**schwarz**); **2** Beads mit anti-Kaninchen-PE AK (**gelb**); **3** Beads mit monoklonalen anti-HA AK (**grün**); **4** Influenza Partikel gekoppelt an die Beads und gefärbt anti-Kaninchen-PE AK (**blau**); **5** Influenza Partikel gekoppelt an die Beads und nachgewiesen mit monoklonalen anti-HA AK und anti-hum-PE AK (**rot**); die Ordinate gibt die Anzahl der Events an; die Abszisse zeigt die Fluoreszenzintensität.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden zwei andere Bead-Typen getestet, um eine eventuell unspezifisch auftretende Bindung des Serums zu reduzieren.

Dabei handelte es sich um, mit Apolipoprotein H beschichtete, ApoH-Beads der Firma ApoH Technologies sowie um tosylaktivierte Dynabeads M-450 der Firma Invitrogen GmbH. Letztere tragen reaktive  $\alpha$ -Sulfonyl Ether an der Oberfläche, welche in der Lage sind, kovalent mit Proteinen oder anderen Liganden über Amino- oder Sulfhydrylgruppe zu reagieren.

Auch bei diesen Einsätzen band das Serum II unspezifisch an die Beads und der Nachweis der Kopplung von LASV Partikeln schlug erneut fehl (Abb.: 37).

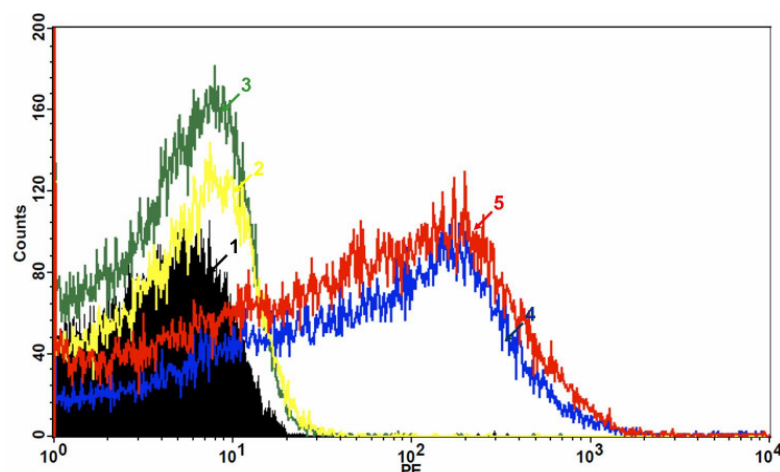


Abbildung 37: **Immobilisieren von pseudotypisierten LASV auf ApoH Beads.** 10  $\mu$ L ApoH-Beads wurden mit  $1 \times 10^7$  pseudotypisierten LASV bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Der Nachweis der Virusbindung erfolgte mit Serum II (1:200) und PE gekoppelten anti-hum AK (1:25) im Durchflusszytometer. Proben: **1** Beads (**schwarz**); **2** Beads mit anti-hum-PE AK (**gelb**); **3** LASV Partikel gekoppelt an die Beads und gefärbt mit anti-hum-PE AK (**grün**); **4** Beads gefärbt mit Serum II und anti-hum-PE AK (**blau**); **5** LASV Partikel gekoppelt an die Beads und nachgewiesen mit Serum II und anti-hum-PE AK (**rot**); die Ordinate gibt die Anzahl der Events an; die Abszisse zeigt die Fluoreszenzintensität.

### **3.5.2. Immobilisierung von pseudotypisierten Viren auf Mikrotiterplatten**

Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung der viralen Partikel stellte die Verwendung von Mikrotiterplatten dar. In dieser Arbeit wurden Mikrotiterplatten der Firmen Nunc, ApoH Technologies und Greiner getestet. In der gleichen Weise wie die magnetischen Beads unterscheiden sich die Platten in ihren Oberflächeneigenschaften. Die Nunc Platten sind vom Hersteller entsprechend der Art der Oberflächenmoleküle in vier Gruppen Poly-, Multi-, Medi-, MaxiSorp unterteilt und konnten entsprechend Lipide, Proteine, Glykane sowie ein Gemisch aus allen drei Komponenten binden. Die Platten von ApoH Technologies zeichnen sich durch eine Apolipoprotein H Beschichtung aus.

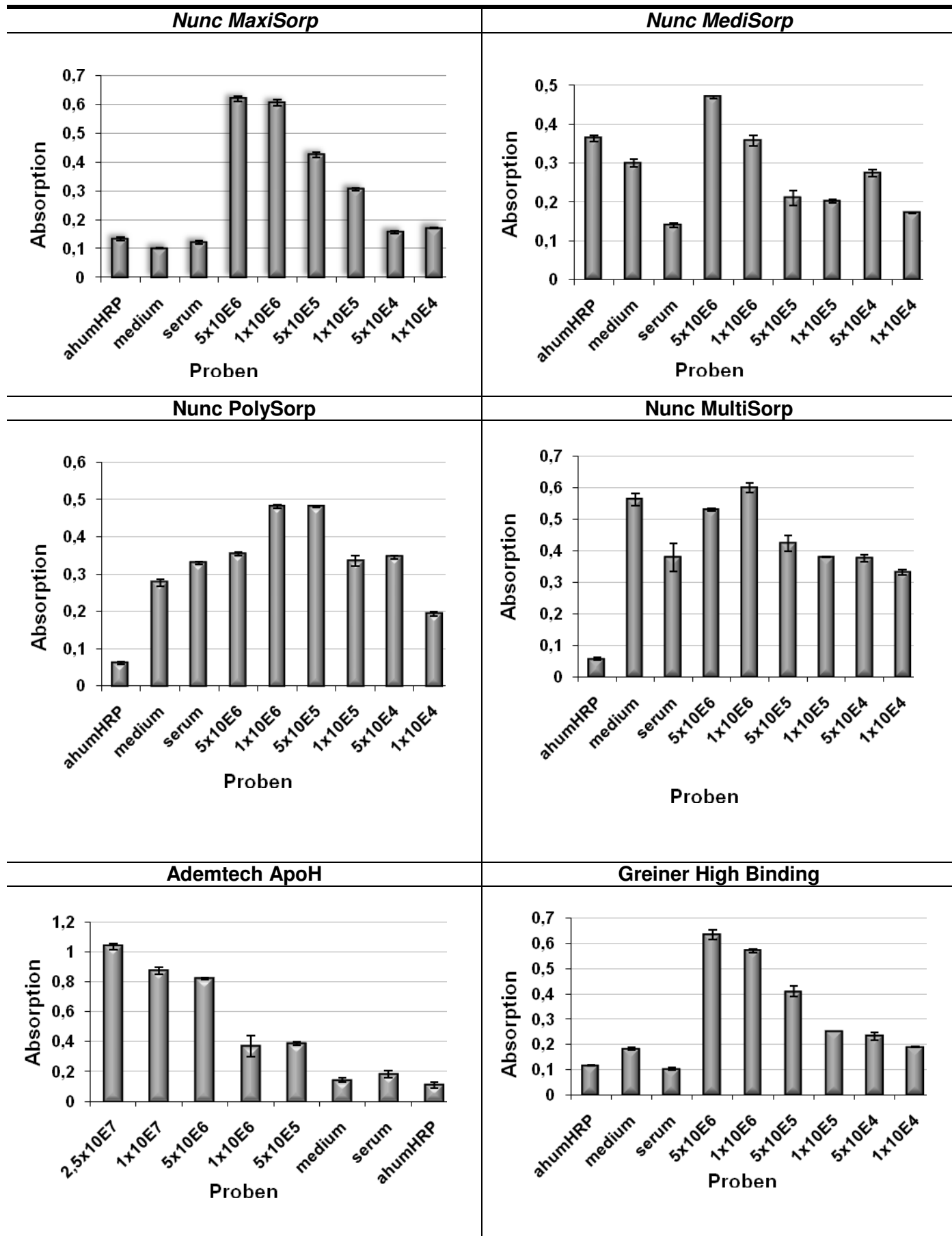
Um die Bindungseigenschaften der verschiedenen Platten zu vergleichen, wurden mehrere Proben mit der gleichen Menge an Lassa Viren über Nacht bei 4 °C immobilisiert, mit 5% BSA abgesättigt und mit dem Patientenserum detektiert. Als Negativkontrolle wurde der in einer Ultrazentrifuge bei 25000 rpm aufkonzentrierte Zellüberstand von nicht transfizierten Zellen verwendet. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Der jeweilige Mittelwert wurde dem entsprechend aus diesem dreifachen Datensatz ermittelt.

Die besten Ergebnisse wurden mit den Platten MaxiSorb, ApoH sowie High Binding von Nunc bzw. ApoH Technologies und Greiner erreicht. Bei der Virusimmobilisierung an diesen Platten konnte eine Abhängigkeit zwischen der Viruskonzentration und dem Absorptionswert festgestellt werden (Abb.: 38).

Das zum Nachweis von Viren verwendete Patientenserum zeigte eine nur sehr geringe unspezifische Bindung an die Platten. Somit konnte der Störeffekt der starken Hintergrundfärbung, welcher stets bei der Verwendung von Beads aufgetreten ist, umgangen werden.

Im Gegensatz dazu band das Serum stark unspezifisch an die Poly- und MultiSorp Platten. Trotz der erzielten Erfolge bei der Virusimmobilisierung auf den Platten war die Stärke der Absorptionssignale nicht ausreichend, um diese Methode endgültig für die Selektion von scFv-Fragmenten zu etablieren.

**Abbildung 38: Immobilisierung der viralen Partikel auf den verschiedenen ELISA-Platten.** 4 Platten von der Firma Nunc, die ApoH-Platte von Ademtech sowie die High Binding Platte der Firma Greiner wurden getestet. Die Platten unterschieden sich in ihren Oberflächeneigenschaften. Die gleichen Mengen an pseudotypisierten Lassa Partikeln wurden auf den Platten immobilisiert. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. Der Nachweis der Virusbindung erfolgte mit Serum III (1:200) und a-hum-HRP AK (1:1000). Als Negativkontrolle diente der aufkonzentrierte Überstand von nicht transfizierten 293T Zellen. Die Messung wurde im ELISA-Reader bei 450 nm (Referenz 650 nm) durchgeführt.



Denn erfahrungsgemäß liegen die Hintergrundsignale bei einem Screeningstest zwischen 0,2 und 0,4. Erst mit der Mengenerhöhung der zu immobilisierenden Viren auf bis zu  $2 \times 10^7$  Partikel pro Well konnte ein Absorptionswert von 1,1 (ApoH-Platte) und 1,4 (High Binding Platte) (Abb.: 41) erreicht werden. Allerdings würde der Einsatz dieser Virusmenge pro Well den Rahmen des zeitlichen sowie finanziellen Aufwandes für die Virusherstellung sprengen. Daher wurde eine weitere Immobilisierungsmethode entwickelt, mit dem Ziel die Virusmenge zu reduzieren.

### 3.5.3. *Alternative Produktion von viralen Partikeln in HeLa sowie CD20/CD34 positiven 293T Zellen*

In Anlehnung an das von der Firma Miltenyi Biotec etablierte System zur Bindung des HI Virus aus verdünnten Blutproben mithilfe von paramagnetischen CD 44 MicroBeads (Terry, Johnston et al. 2009) wurde im Rahmen dieser Arbeit eine ähnliche Methode entwickelt, um die Spezifität der viralen Bindung an die Trägermoleküle zu erhöhen und dadurch die pro Well benötigte Virusmenge herabzusetzen.

Dabei macht man sich zu Nutze, dass gewisse zelluläre Proteine während der Knospung in die virale Hülle integriert werden (Cantin, Martin et al. 2001). Bei solchen Wirts-Proteinen handelt es sich meistens um CD Marker, Hitzeschockproteine oder vaskuläre Transportproteine. Durch die Bindung dieser zellulären Moleküle an die mit entsprechenden Antikörpern beschichteten magnetischen Beads werden die Viren aus einer Probe selektiert und angereichert (Abb.: 39).

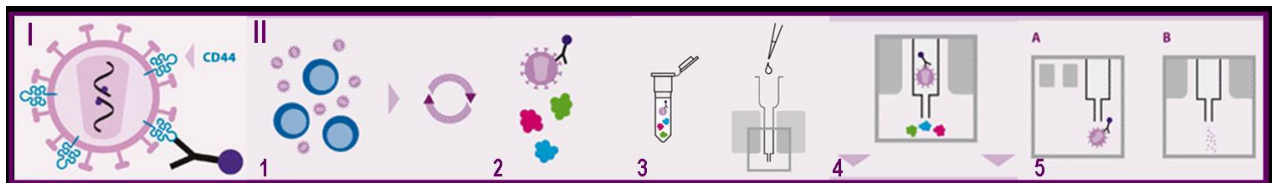


Abbildung 39: **µMACS VitalVirus HIV Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec.** **Teil I:** MACS® MicroBeads für HIV-1-Isolierung und Anreicherung binden spezifisch an die in der Virushülle integrierten Wirt-Proteine CD44; **Teil II:** Prozedur der HIV-1 Isolierung: **1:** Probenzentrifugation; **2:** Zugabe von CD 44 MicroBeads zum Überstand; **3:** Separation des Überstandes über µ MACS Säule; **4:** mehrere Waschschrte zum Entfernen von Proteinen oder Antikörpern; **5:** Elution oder Lysis von Viren; (www.miltenyibiotec.com).

Das bereits erwähnte System von Miltenyi Biotec basiert auf HeLa Zellen, welche auf ihrer Oberfläche einen spezifischen CD 44 Marker tragen, der unter nativen Bedingungen in die Zell-Zell-Interaktion, die Zelladhäsion sowie –Migration involviert ist. Die in diesen Zellen hergestellten HI Viren weisen entsprechend diese Proteine in ihrer Hülle auf.

Zu Beginn wurden die pseudoviralen Lassa-Partikel nach dem Standardprotokoll für das 3-Vektor-Transfektionssystem in den HeLa Zellen produziert. Allerdings haben die HeLa Zellen im Gegensatz zu 293T Zellen kein *SV40 large T-Antigen*, welches die DNA Replikation von

episomalen Plasmiden mit dem SV40 Replikationsursprung erhöht. Der Titer der viralen Lassa-Partikel lag somit nach der Aufkonzentrierung über Saccharose-Kissen (20% in PBS) bei  $6 \times 10^5$  und war absolut nicht ausreichend um die Bindungseigenschaften der produzierten Viren zu untersuchen.

Im weiteren Verlauf wurde eine 293T Zelllinie hergestellt, welche die Zelloberflächenmarker CD20 sowie CD34 stabil exprimierte. Das Konstrukt zur Transduktion der Zellen wurde in Form der retroviralen pseudotypisierten Viren von Dr. M. Grez zur Verfügung gestellt und trägt im Transfervektor die Gene für CD20 und CD34 Proteine. Mithilfe des MACS Separationssystems von Miltenyi Biotec wurden die transduzierten 293T Zellen angereichert, so dass ca. 95% der Zellpopulation CD20/CD34 positiv waren (Abb.: 40). Der Nachweis der Expression erfolgte mit anti-hum. CD34 bzw. anti-hum. CD20 Antikörpern, welche entsprechend mit PE-Cy5.5 und PE gekoppelt waren. Diese CD20/CD34 positiven Zellen wurden zur Herstellung der pseudotypisierten LASV<sub>CD20/CD34</sub> sowie MLV<sub>CD20/CD34</sub> Partikel eingesetzt.

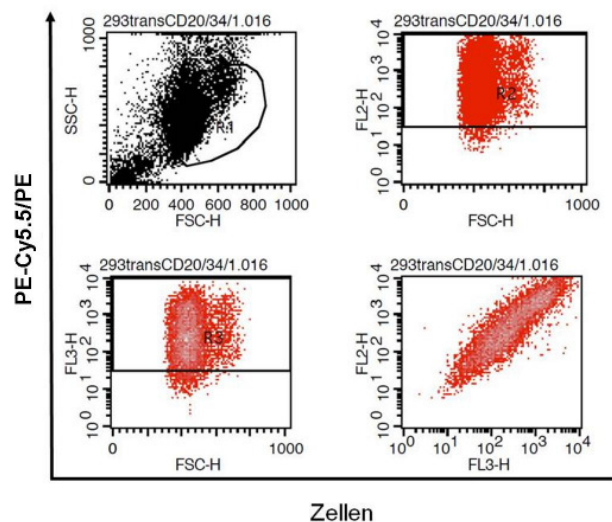


Abbildung 40: **Produktion der stabil transduzierten, CD20/CD34 exprimierenden 293T Zellen zur Herstellung von pseudotypisierten LASV<sub>CD20/CD34</sub> sowie MLV<sub>CD20/CD34</sub> Partikeln.** Nach der Transduktion und Separation über MACS LS Säulen wurden die CD20/CD34 positiven 293T Zellen mit anti-hum-PE-Cy5.5-CD34 AK (1:100) und anti-hum-PE-CD20 AK (1:100) gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen.

### **3.5.4. Immobilisierung der in 293T CD20/CD34 positiven Zellen hergestellten pseudotypisierten Viren**

Die Herstellung der pseudotypisierten LASV<sub>CD20/CD34</sub> sowie MLV<sub>CD20/CD34</sub> Partikel erfolgte nach dem Standardprotokoll für  $\gamma$ -retrovirale Verpackung. Der Titer der Pseudotypen lag bei  $1 \times 10^8$  für LASV und bei  $5 \times 10^6$  für MLV. Zur Virusimmobilisierung wurden zwei verschiedene Strategien getestet. Bei der ersten Strategie handelte es sich um einen Sandwich-ELISA, wobei 100 ng anti-CD34-Antikörper aus Kaninchen von zwei verschiedenen Herstellern auf der High Binding Platte der Firma Greiner gebunden und mit  $1 \times 10^7$  LASV<sub>CD20/CD34</sub> pro Well über Nacht bei 4°C inkubiert

werden. Nach dem Blocken mit 5% BSA erfolgte der Nachweis der Virusbindung mithilfe des Serums IV und anti-humanen, mit HRP gekoppelten, Antikörpern. In einem anderen Verfahren wurden die Pseudoviren direkt auf der Platte immobilisiert und nach dem Blocken mit Serum IV oder anti-CD34-Antikörpern detektiert (Abb.: 41).

Die Bindung der Lassa Partikel konnte bei beiden Vorgehensweisen mit Serum IV nachgewiesen werden. Auch die an die Platte gebundenen anti-CD34-Antikörper wurden mit HRP konjugierten Antikörpern aus Kaninchen detektiert. Hingegen schlug der Nachweis der immobilisierten Viren mit anti-CD34- sowie anti-CD20-Antikörpern (Letztere sind in der Abbildung nicht gezeigt) fehl, was darauf hindeutet, dass beide Marker nicht in die Virushülle inkorporiert wurden.

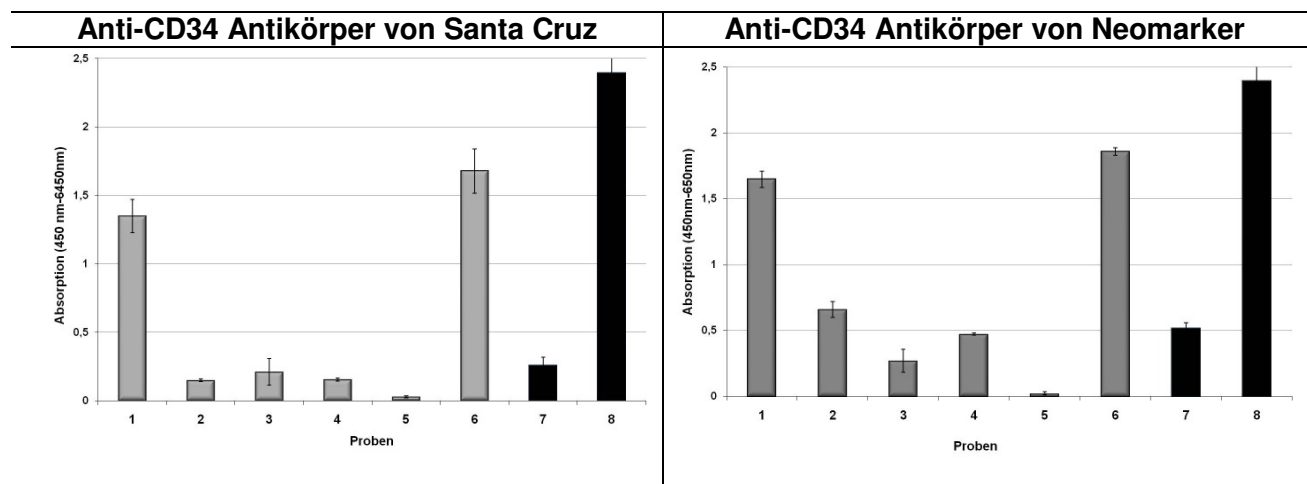


Abbildung 41: **ELISA Test mit pseudotypisierten LASV<sub>CD20/CD34</sub> Partikeln und anti-CD34 AK von Santa Cruz sowie Neomarkers.** Im Versuch sind  $1 \times 10^7$  LASV<sub>CD20/CD34</sub> pro Well eingesetzt worden. **Proben 1 – 6:** 100 ng CD34 Antikörper von Santa Cruz bzw. Neomarker wurden direkt auf der Platte immobilisiert. **1:** LASV<sub>CD20/CD34</sub> detektiert mit Serum IV (1:200) und a-hum-HRP AK (1:1000); **2:** LASV<sub>CD20/CD34</sub> mit hum. neg. Serum (1:200) und anti-hum-HRP AK (1:1000); **3:** Serum IV (1:200) inkubiert mit anti-hum-HRP AK (1:1000); **4:** hum. neg. Serum (1:200) inkubiert mit anti-hum-HRP AK (1:1000); **5:** anti-hum-HRP AK (1:1000); **6:** anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); **Proben 7-8:** pseudotypisierte LASV<sub>CD20/CD34</sub> wurden direkt auf der Platte immobilisiert. **7:** CD34 (1:100) detektiert mithilfe von anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); **8:** Serum IV (1:200) inkubiert mit anti-hum-HRP AK (1:1000).

Allerdings konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht demonstriert werden, ob beide Marker auf der Zelloberfläche in die „Lipid Rafts“ integriert sind, wobei es sich bei letzteren nach neuesten Erkenntnissen um den Ort der Zusammensetzung und Knospung von Viren handelt.

Einen weiteren Beweis dafür lieferte der Test mit chimären monoklonalen anti-CD20-Antikörpern, welche unter dem industriellen Namen Rituximab bekannt sind. Auch bei diesem Versuch sind beide Strategien angewandt worden, wobei die Viren entweder direkt oder über die auf der High Binding Platte (Greiner) gebundenen anti-CD20-Antikörper immobilisiert wurden (Abb.: 42). Wie aus der Abbildung folgt, konnten die gebundenen Viren zwar mithilfe des Patientenserums IV sowie anti-MLV Serum auf der Platte nachgewiesen werden (Proben 1 und 4), allerdings nicht

oder sehr gering mittels anti-CD20 Antikörpern (Probe 12,13). Dies bestätigte die Annahme, dass die entsprechenden Marker nicht in die virale Hülle integriert waren.

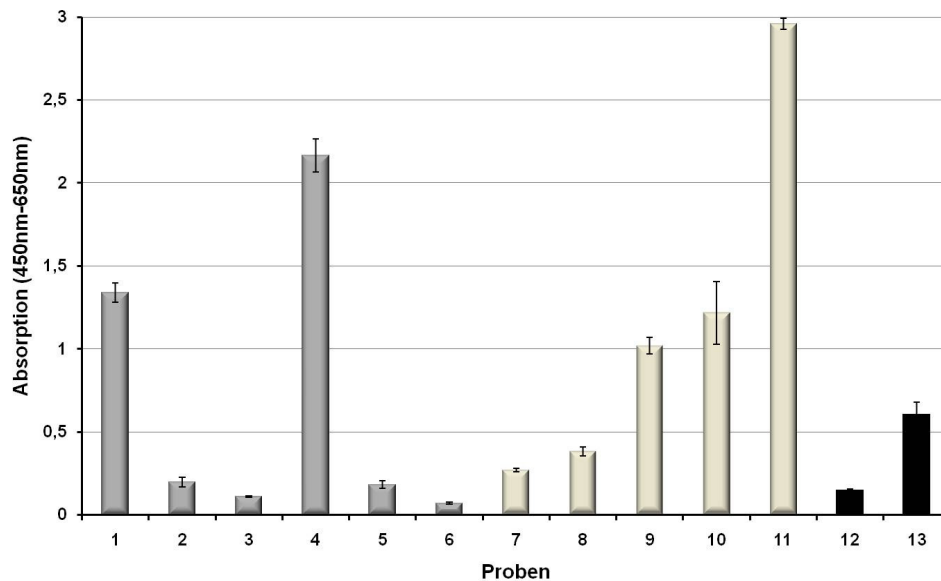


Abbildung 42: **ELISA Test mit pseudotypisierten LASV<sub>CD20/CD34</sub> und MLV<sub>CD20/CD34</sub> Partikeln und CD 20 (Retuximab).** Im Versuch wurden  $1 \times 10^7$  LASV<sub>CD20/CD34</sub> sowie  $1 \times 10^5$  MLV<sub>CD20/CD34</sub> pro Well eingesetzt. **Proben 1-6:** die LASV<sub>CD20/CD34</sub> und MLV<sub>CD20/CD34</sub> Partikel wurden direkt auf der Platte immobilisiert. **1:** LASV<sub>CD20/CD34</sub> detektiert mit Serum IV (1:200) und anti-hum-HRP AK (1:1000); **2:** LASV<sub>CD20/CD34</sub> inkubiert mit hum. neg. Serum (1:200) und anti-hum-HRP AK; **3:** LASV<sub>CD20/CD34</sub> inkubiert mit anti-hum-HRP AK; **4:** MLV<sub>CD20/CD34</sub> detektiert anti-MLV Serum (1:400) und anti-Ziege-HRP AK; **5:** MLV<sub>CD20/CD34</sub> inkubiert mit hum. neg. Serum (1:200) und anti-hum-HRP AK (1:1000); **6:** MLV<sub>CD20/CD34</sub> inkubiert mit anti-Ziege-HRP AK; **Proben 7-11:** 300 ng anti-CD20 (Rituximab) Antikörper wurden direkt auf der Platte immobilisiert. **7:** Serum V inkubiert mit anti-hum-HRP AK; **8:** anti-MLV Serum inkubiert mit anti-Ziege-HRP AK; **Proben 9-10:**  $1 \times 10^7$  LASV<sub>CD20/CD34</sub> bzw.  $1 \times 10^5$  MLV<sub>CD20/CD34</sub> pro Well wurden mit Retuximab inkubiert; **9:** LASV<sub>CD20/CD34</sub> detektiert mit Serum V und anti-hum-HRP AK; **10:** MLV<sub>CD20/CD34</sub> detektiert anti-MLV Serum (1:400) und anti-Ziege-HRP AK; **11:** anti-hum-HRP AK; **Proben 12-13:** die LASV<sub>CD20/CD34</sub> und MLV<sub>CD20/CD34</sub> wurden direkt an der Platte immobilisiert; **12:** LASV<sub>CD20/CD34</sub> detektiert mit anti-CD20 AK und anti-hum-HRP AK; **13:** MLV<sub>CD20/CD34</sub> detektiert mit anti-CD20 AK und anti-hum-HRP AK.

### 3.5.5. Immobilisierung von viralen Partikeln mithilfe der Streptavidin-Biotin-Bindung

Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung viraler Partikel basiert auf den starken nicht polaren Streptavidin-Biotin-Wechselwirkungen. Hierfür wurden die Viren mit in PBS gelöstem Biotin auf Eis inkubiert, um sie anschließend auf die mit Streptavidin konjugierten Träger zu binden. Als solche Träger kamen zum einen magnetische Dynabeads® M-280 Streptavidin der Invitrogen GmbH Dynal, zum anderen mit Streptavidin beschichtete (300 ng/Well) High Binding ELISA Platten der Firma Greiner zum Einsatz (Abb.).

In ersten Schritt wurden  $5 \times 10^6$  Lassa- bzw.  $1 \times 10^5$  MLV-Partikel mit 5 µg in PBS gelöstem Biotin inkubiert (Endkonzentration 1 µg/µL), über Nacht bei 4°C dialysiert und anschließend an  $5 \times 10^5$  Beads immobilisiert (Abb.: 43). Bei den 5 µg Biotin handelt es sich um einen 100-fachen Überschuss der im Kapitel 2.6.2. für  $1 \times 10^8$  Viren errechneten Menge, welche über das Oberflächenverhältnis zwischen einem Virus und einer Zelle bestimmt wurde. Die eingesetzten



Mengen an Pseudoviren beziehen sich auf Erfahrungswerte mit anderen viralen Partikeln wie HIV und Influenza.

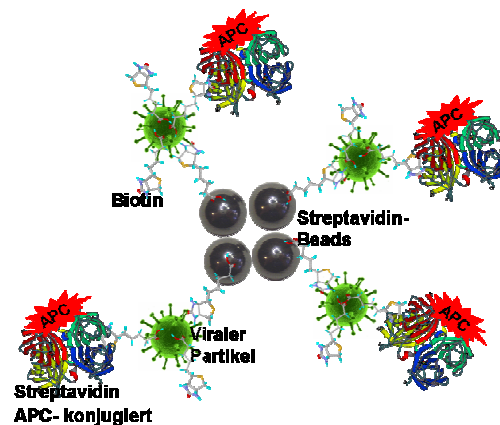


Abbildung 43: **Der Aufbau des Versuches zur Kopplung der viralen Partikel an magnetische Streptavidin-Beads.** Der Nachweis der gekoppelten Viren erfolgte im Durchflusszytometer mit Streptavidin-APC (1:20)

Der Nachweis erfolgte mit APC-gekoppeltem Streptavidin im Durchflusszytometer. Um die unspezifische Binding von nicht dialysiertem Biotin in der Probe an die Streptavidin-Beads auszuschließen, wurde die gleiche Menge an Biotin auf die gleiche Weise behandelt wie die Proben mit Viruspartikeln.

Wie aus Abbildung 44 folgt, war die Biotinylierung sowie die darauf folgende Immobilisierung von Viren erfolgreich.

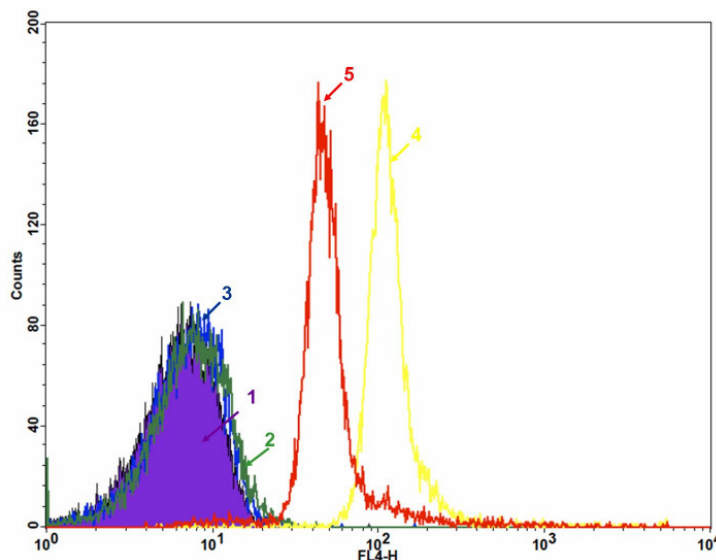


Abbildung 44: **Immobilisierung von pseudotypisierten biotinylierten LASV auf M-280 Streptavidin Beads.**  $5 \times 10^5$  Beads wurden mit  $5 \times 10^6$  bzw.  $1 \times 10^5$  biotinylierten LASV und MLV bei  $4^\circ\text{C}$  unter ständigem Rotieren inkubiert. Der Nachweis der Virusbindung erfolgte mit APC-gekoppeltem Streptavidin (1:100) im Durchflusszytometer. Proben: 1 Beads (lila); 2 Beads inkubiert mit Streptavidin-APC (grün); 3 Beads inkubiert mit  $5\mu\text{g}$  dialysiertem Biotin (blau); 4 MLV auf den Beads gefärbt mit Streptavidin-APC (gelb); 5 LASV auf den Beads gefärbt mit Streptavidin-APC (rot).

Die Fluoreszenz der positiven Beads lag für beide Proben bei 95%. Die Kontrollprobe mit Biotin zeigte keine unspezifische Bindung an die Streptavidin-Beads, womit die effiziente Biotin-Dialyse nachgewiesen werden konnte.

Wie bereits erwähnt, wurde im Versuch die Biotinmenge im Überschuss eingesetzt. Als Nächstes sollte die optimale Menge experimentell bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden  $0,05\mu\text{g}$ ,  $0,1$



$\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$  sowie 10  $\mu\text{g}$  Biotin mit  $5 \times 10^6$  Lassa-Partikeln inkubiert und anschließend nach dem bereits oben beschriebenen Protokoll behandelt.

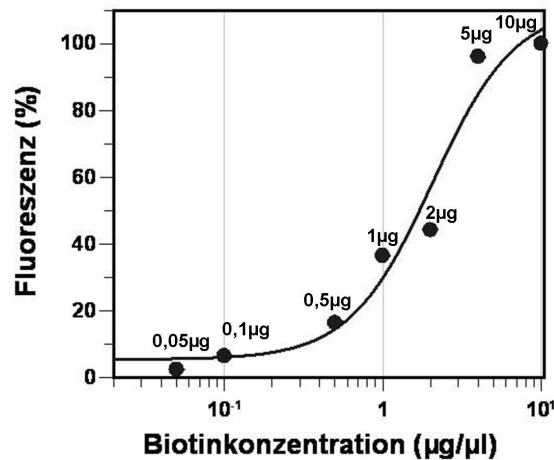


Abbildung 45: **Bestimmung der zur Immobilisierung von Viren benötigten Biotinmenge.** Die Bestimmung erfolgte mit viralen Lassa Partikeln; die Viren wurden mit der entsprechenden Biotinmenge inkubiert, dialysiert und an magnetische Beads gekoppelt; nach der Färbung mit Streptavidin-APC (1:100) wurden die Proben im Durchflusszytometer gemessen.

Wie aus dem Graphen hervorgeht (Abb.: 55), lag die Fluoreszenz der mit 0,05  $\mu\text{g}$  biotinylierten Probe bei ca. 7%. Mit zunehmender Biotinmenge stieg auch die prozentuale Fluoreszenzintensität bis hin zu einer Sättigung bei der Probe mit 5  $\mu\text{g}$  Biotin an. Da sich die Fluoreszenzintensität nur geringfügig zwischen den Biotinmengen von 5  $\mu\text{g}$  und 10  $\mu\text{g}$  unterschied, wurde zur Virusbiotinylierung für das nachfolgende Biopanning 5  $\mu\text{g}$  Biotin verwendet.

Nach der erfolgreichen Kopplung der Viren an die magnetischen Beads wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auch die Bindung der biotinylierten Viruspartikel auf die ELISA-Platten etabliert. Dies war substantiell, um die aus dem Biopanning gewonnenen scFv-Fragmente in einem Screening schnell und effizient auf ihre Bindungsspezifität hin analysieren zu können. Zu diesem Zweck wurden die High Binding Platten mit 300 ng Streptavidin pro Well beschichtet. Die Bindung des Streptavidins auf die Platte wurde mithilfe von Biotin und einem weiteren HRP-konjugierten Antikörper nachgewiesen. Die Absorption wurde bei 450 nm im Photometer gemessen und betrug 3,5. Dieser Wert weist darauf hin, dass die Sättigung der Bindungsplätze mit 300 ng Streptavidin erreicht werden konnte. Die Biotinylierung der zu immobilisierenden viralen Partikel erfolgte nach dem für die Beads etablierten Protokoll und wurde stets im Durchflusszytometer kontrolliert.

Da bereits mit  $5 \times 10^6$  LASV- und  $1 \times 10^5$  für MLV-Partikeln starke Signale bei der Messung im Durchflusszytometer erzielt werden konnten, wurden für diese Versuche jeweils  $1 \times 10^6$  virale LASV-Partikel und  $5 \times 10^4$  virale MLV-Partikel pro Well eingesetzt.

Zum Nachweis der Virusbindung wurden sowohl das mit HRP konjugierte Streptavidin als auch die polyklonalen Seren gegen die Hüllproteine verwendet. Bei den polyklonalen Seren handelt es sich zum einen um das Serum IV und V des Lassa Fieber erkrankten Patienten und zum anderen

um das anti-MLV Serum aus einer Ziege. Des Weiteren wurde als negative Kontrolle ein Serumpool aus mehreren gesunden Spendern eingesetzt (Abb.: 46).

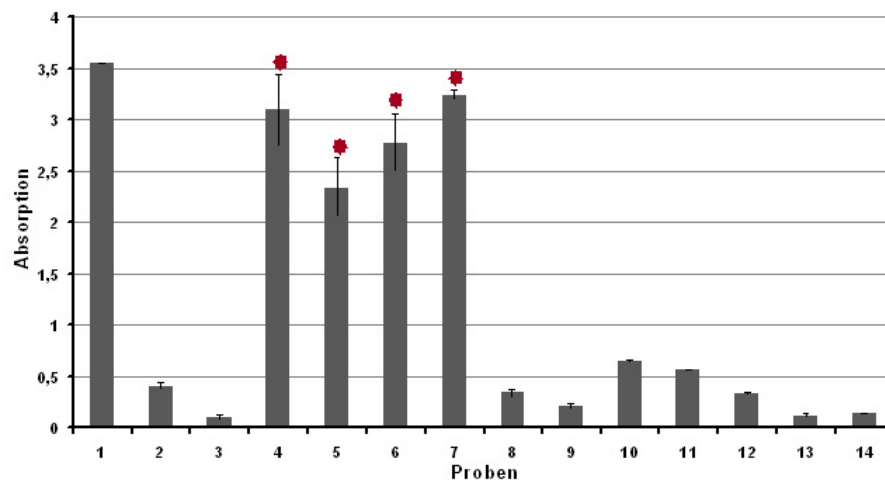


Abbildung 46: **Immobilisierung viraler biotinylierter Partikel auf der ELISA Platte via Biotin/Streptavidin Bindung.** Die Platte wurde mit 300 ng Streptavidin beschichtet;  $1 \times 10^6$  LASV bzw.  $1 \times 10^5$  MLV pro Well wurden immobilisiert. **1.** Nachweis der Streptavidinbindung an die Platte mit anti-Ziege-Biotin-HRP AK (1:200); **2:** dialysierte Biotinprobe detektiert mit Streptavidin-HRP(1:200), **3:** Streptavidin-HRP (1:200); **4:** LASV Partikel detektiert mit Streptavidin-HRP (1:200); **5:** LASV-Partikel detektiert mit Serum V (1:200) und anti-hum-HRP AK (1:1000); **6:** MLV-Partikel detektiert mit Streptavidin-HRP (1:200); **7:** MLV-Partikel detektiert mit anti-MLV Serum (1:500) und anti-Ziege-HRP AK (1:1000); **8:** LASV Partikel inkubiert mit hum. neg. Serumpool (1:200) und anti-hum-HRP AK (1:1000); **9:** MLV-Partikel inkubiert mit hum. neg. Serum-Pool (1:200) und anti-hum-HRP AK (1:1000); **10:** anti-MLV Serum aus Ziege (1:500) inkubiert mit anti-Ziege-HRP AK (1:1000); **11:** Serum V (1:200) mit anti-hum-HRP AK (1:1000); **12:** hum. neg. Serum-Pool (1:200) inkubiert mit einem anti-hum-HRP AK (1:1000); **13:** anti-hum-HRP AK (1:1000); **14:** anti-Ziege-HRP AK (1:1000); **roter Stern:** die positiven Proben

Die Bindung beider viraler Partikel konnte sowohl mit Streptavidin als auch mit den polyklonalen Seren detektiert werden. Die Absorption der an die Platte gebundenen LASV sowie MLV Partikel lag zwischen 2,5 und 3,5 und war um das Fünffache höher als die der Negativkontrollen (Abb.: 46). Die Stärke der positiven Signale deutet darauf hin, dass mit der eingesetzten Menge der viralen Partikel eine Sättigung der Bindungsplätze erreicht wurde. In den nachfolgenden Versuchen wurde die Partikelmenge auf  $5 \times 10^5$  LASV bzw.  $1 \times 10^4$  für MLV reduziert. Im Vergleich zu bereits oben beschriebenen Ansätzen zur Immobilisierung von Viren konnte anhand der Biotinylierung von Viruspartikeln eine enorme Reduzierung der für das Screening benötigten Virusmenge und des damit verbundenen zeitlichen Aufwandes zur Partikelproduktion erreicht werden.

### 3.5.6. Überprüfung der Infektiösität von biotinylierten Partikeln

Nach der erfolgreichen Immobilisierung von viralen Partikeln mit Biotin sollte nun gezeigt werden, dass die Biotinylierung der Viren deren Infektiösität nicht beeinträchtigt und die funktionellen Epitope an der viralen Oberfläche nach wie vor leicht zugänglich sind. Hierfür wurden drei verschiedene Virusproben vorbereitet (Abb.: 47). Die erste Probe beinhaltete nicht-biotinylierte

Viren mit einer MOI von 0,1, welche direkt zu den Zellen gegeben wurden. Bei der zweiten Probe handelte es sich um die biotinylierten und über Nacht dialysierten Viren (MOI 0,1), welche zur Transduktion der Zellen eingesetzt wurden. Die Viren aus der dritten Probe wurden nach der Biotinylierung und Dialyse mit einem Überschuss an magnetischen Beads ( $1 \times 10^7$ ) ca. 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Beads sedimentiert und der Überstand wurde zu den Zellen pipettiert. Mit diesem Ansatz sollte die Biotinylierungs- und anschließende Bindungseffizienz der viralen Partikel demonstriert werden. Zur Kontrolle wurde eine weitere Probe mitgeführt, welche ausschließlich die entsprechende Biotinmenge enthalten hat. 72 Stunden nach der Transduktion wurde die GFP Fluoreszenz in den Zellen mithilfe des Durchflusszytometers gemessen. Der Versuch wurde mit beiden Virustypen durchgeführt, wobei für die Tests mit MLV L929 Zellen verwendet wurden.

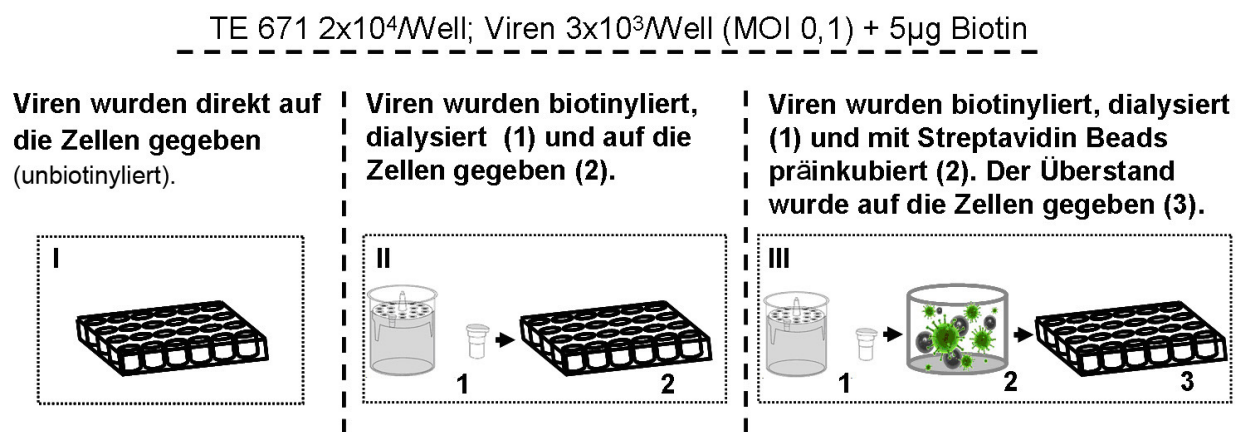


Abbildung 47: Versuchsaufbau zum Nachweis der viralen Infektiösität.

Bei der Transduktion der Zellen mit biotinylierten Viren konnte im Vergleich zu den unbehandelten Proben eine Abnahme der Fluoreszenz um 15% festgestellt werden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass es während der Biotinylierung und Dialyse zu einem Verlust viraler Partikel kommt, so dass die geringere Transduktion nicht unbedingt auf einen Verlust der Infektiösität hindeuten muss (Abb.: 48)

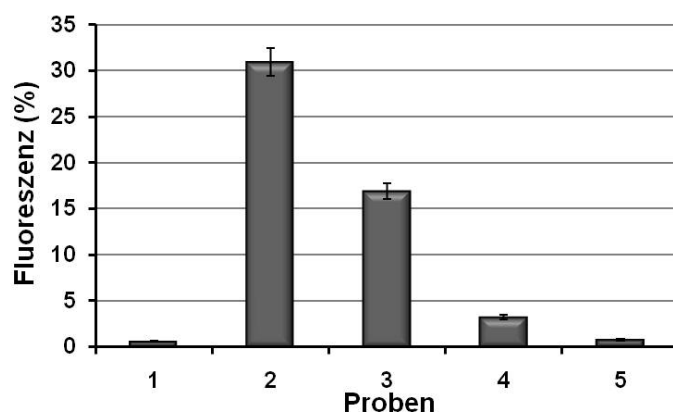


Abbildung 48: **Transduktionseffizienz der biotinylierten Lassa-Partikel.** TE 671 wurden mit Lassa Viren (MOI 0,1), welche unterschiedlich behandelt waren, transduziert. 72 Stunden später wurde die GFP-Fluoreszenz in den Zellen im Durchflusszytometer detektiert. 1: nicht-transduzierte TE 671 Zellen; 2: Zellen transduziert mit nicht-biotinylierten Lassa Viren; 3: Zellen transduziert mit biotinylierten Lassa Partikeln; 4: Zellen transduziert mit dem Überstand, erhalten nach dem Capturing der biotinylierten Lassa Partikel auf den Streptavidin Beads; 5: Zellen mit Biotinprobe.

Die mit dem Überstand der sedimentierten Beads erzielte Transduktionsrate lag bei 3,2% und war, verglichen mit der der Proben I und II, deutlich niedriger. Dieses Ergebnis demonstrierte die hohe Biotinylierungseffizienz von Viren und lieferte einen eindeutigen Beweis dafür, dass die Behandlung von Viren mit Biotin und die anschließende Dialyse die Infektiösität der Viren nicht beeinflusst und die Epitope für die Antikörper weiterhin zugänglich sind.

### 3.5.7. Bindung der löslichen Glykoproteine 1

Als weiteres Target für die Antikörperselektion fungierten die in den 293H Zellen produzierten löslichen  $\Delta$  GP1-Proteine. Für die Proteinimmobilisierung wurden die High Binding Platten von Greiner verwendet. Dabei wurden 300  $\mu$ L pro Well von HA- $\Delta$ GP1-Flag- bzw. HA- $\Delta$ GP1-Fc Überständen über Nacht bei 4°C inkubiert und die freien Bindestellen an der Platte mit 5% BSA in PBS geblockt. Der Nachweis erfolgte mit den Seren IV oder V sowie einem anti-Lassa-AV Serum aus Kaninchen. Als negative Kontrolle dienten ein humaner LASV-negativer Serum-Pool sowie ein Serum aus Kaninchen (Abb.: 49). Aus dem Graphen wird ersichtlich, dass eine Bindung der beiden löslichen GP1-Konstrukte sowohl mit Serum V als auch mit anti-Lassa-AV Serum nachgewiesen werden konnte. Außerdem zeigten die Proteine keine unspezifischen Kreuzreaktionen mit den negativen Seren. Das HA- $\Delta$ GP1-Flag-Konstrukt wies, verglichen, mit HA- $\Delta$ GP1-Fc höhere Absorptionswerte auf, was darauf zurückzuführen ist, dass die großen Fc-Fragmente den Zugang zu den GP1 für die polyklonalen Antikörper erschwerten.

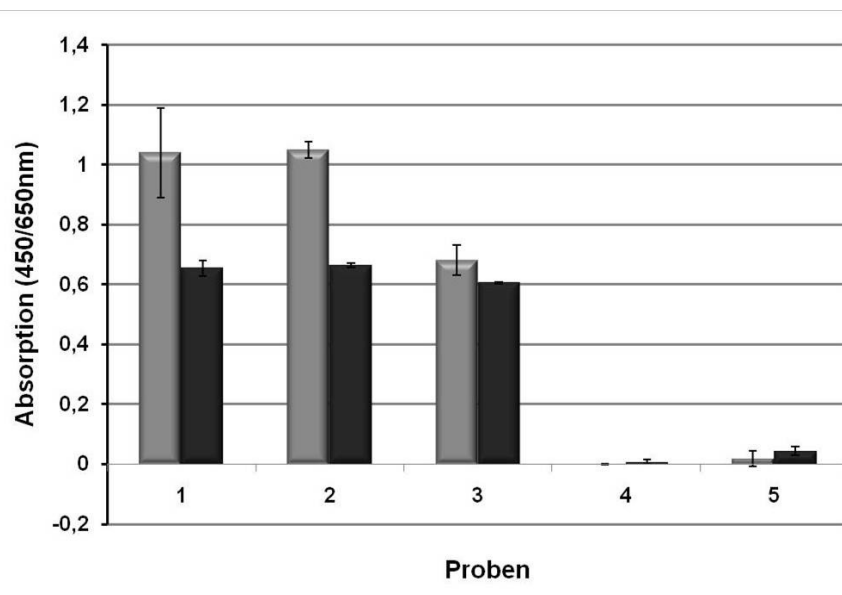


Abbildung 49: **Immobilisierung der löslichen GP1-Konstrukte an der High Binding Platte.** 300  $\mu$ L pro Well von HA- $\Delta$ GP1-Flag (**grau**) bzw. HA- $\Delta$ GP1-Fc (**schwarz**) Überstände wurden UN bei 4°C inkubiert und die freien Bindestellen mit 5% BSA im PBS geblockt. Der Nachweis erfolgte mit Seren IV oder V (1:200) sowie einem anti-Lassa-AV Serum aus Kaninchen (1:500). Als negative Kontrolle fungierte ein humaner LASV-negativer Serum-Pool (1:200) und ein Serum aus Kaninchen (1:500). **Proben:** 1: GP1-Konstrukte detektiert mit Serum V; 2: GP1-Konstrukte detektiert mit Serum IV; 3: GP1-Konstrukte detektiert mit anti-Lassa-AV Serum; 4: GP1-Konstrukte inkubiert mit hum. neg. Serum-Pool; 5: GP1-Konstrukte inkubiert mit neg. Serum aus Kaninchen.

### **3.6. Selektion und Charakterisierung von LASV-GPC-spezifischen scFv-Antikörperfragmenten**

#### **3.6.1. Selektion von LASV-GPC-spezifischen scFv-Antikörperfragmenten aus der Immunbibliothek.**

Zur Selektion von scFv-Fragmenten aus der Immunbibliothek wurden die pseudotypisierten LF- sowie ML-Viren biotinyliert und auf Streptavidinbeads immobilisiert. Die Effizienz der Virusimmobilisierung auf die Beads wurde stets vor der jeweiligen Selektionsrunde mittels Immunfärbung im Durchflusszytometer kontrolliert. Jede Selektionsrunde bestand aus zwei Schritten. Zuerst erfolgte eine negative Selektion, wobei je 500 µL der  $\lambda$  bzw.  $\kappa$  Bibliotheken gemischt mit immobilisierten ML-Viren 2 Stunden bei 4 °C inkubiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen und für die Inkubation mit den LASV Partikeln verwendet. Nach jeder positiven Selektionsrunde auf den immobilisierten Lassa-Viren wurden die gebundenen Phagen mithilfe von Trypsin eluiert, wobei das Enzym innerhalb des scFv-Fragmentes schneidet und Phagenpartikel einschließlich der für die Bakterieninfektion wichtigen pIII Proteine nicht degradiert werden. Zur Titerbestimmung der eluierten Phagen wurden eine Verdünnungsreihe  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  vorbereitet. Nach der Infektion wurden die Bakterien ausgestrichen und die Zahl der über Nacht gewachsenen Kolonien ermittelt (Abb.: 50).

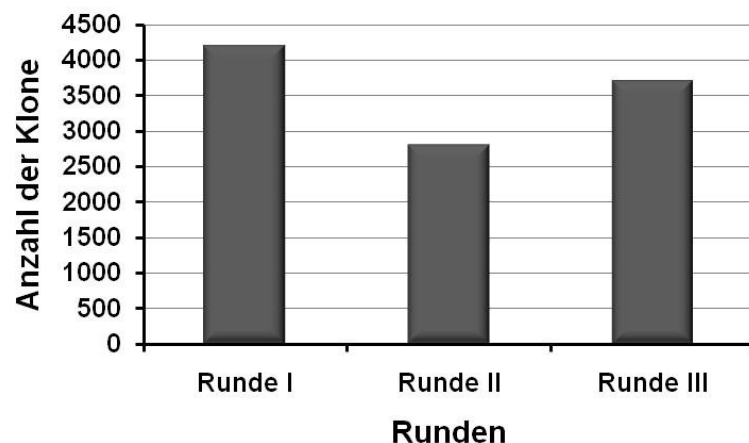


Abbildung 50: **Anzahl der Bakterienklone nach jeder positiven Selektionsrunde.** Nach der positiven Selektion wurden die an die Lassa-Viren gebundenen Phagen mithilfe von Trypsin eluiert und für die Infektion von XL-1 Blue Bakterien eingesetzt. Die Anzahl der Klone wurde aus der Phagen-Verdünnungsreihe berechnet.

Nach der ersten Selektionsrunde lag die Zahl der eluierten Phagen bei 4300. Nach der zweiten Runde wurde eine Verringerung der Klonenanzahl auf 2700 beobachtet. In der dritten Runde stieg die Zahl der positiven Klone auf 3800, was auf eine Anreicherung der spezifischen Phagen hindeutet.

Darüber hinaus wurden nach jeder durchgeführten Selektionsrunde die neu verpackten Phagen im Western Blot analysiert. Hierfür wurden 10 µL Phagen mit Probenpuffer versetzt, denaturiert und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten erfolgte der Nachweis der scFv-pIII Fusionsproteine sowie der freiliegenden Hüllproteine mit einem anti pIII Antikörper. Den Erwartungen entsprechend waren im Blot Signale bei 62 bzw. 100 kDa zu erkennen (Abb.: 51).

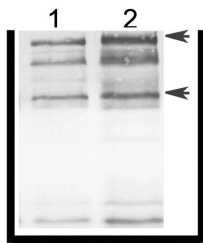


Abbildung 51: **Kontrolle der Phagenverpackung im Western Blot nach zwei Selektionsrunden.** 10 µL der eluierten Phagen wurden mit  $\beta$ -Mercaptoethanol-Probenpuffer versetzt, denaturiert und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten erfolgte die Detektion der Proteine mit einem monoklonalen anti pIII Antikörper aus Maus (1:2000) und einem mit AP gekoppelten anti-Maus Antikörper aus Ziege (1:5000). Die Visualisierung wurde mit NBT und BCIP durchgeführt. Pfeile markieren bei 100 kDa die scFv::pIII Fusionsproteine und bei 62 kDa pIII Proteine ohne scFv-Fragmente; 1: eluierte Phagen nach der ersten Selektion; 2: eluierte Phagen nach der zweiten Selektion.

Die scFv-Fusionsproteine wurden als Doppelbande detektiert. Weitere visualisierte Proteinfragmente entstanden durch die Denaturierung der Probe.

### 3.6.2. Analyse der Bindungsspezifität der selektierten scFv-Antikörperfragmente im ELISA-Test

Um die Bindungseigenschaften der selektierten Phagen zu analysieren, wurden 72 Klone aus der dritten Selektionsrunde gepickt und über Nacht in einer 96 Well Platte anwachsen gelassen. Durch das Entfernen von Glukose und die Zugabe von IPTG wurde das *lac*-Operon aktiviert, was eine scFv-Genexpression zur Folge hatte. Dabei wurde das im Vektor eingebaute *amber*-Stopkodon erkannt und die Produktion des pIII Proteins gehemmt. Die löslichen scFv-Fragmente werden in das bakterielle Periplasma transportiert. Durch mechanischen Stress erreichte man eine Lockerung der äußeren Bakterienmembran, wodurch die im Periplasma akkumulierten Antikörperfragmente freigesetzt werden können.

Als Target für die Analyse dienten die an der ELISA-Platte (High Binding der Firma Greiner) über die Streptavidin-Biotin-Bindung immobilisierten viralen Partikel. 100 µL des Überstands mit scFv-Proteinen wurde pro Vertiefung zugegeben und die Bindung mithilfe von anti-c-myc-HRP Antikörpern in einem Photometer detektiert (Abb.: 52).

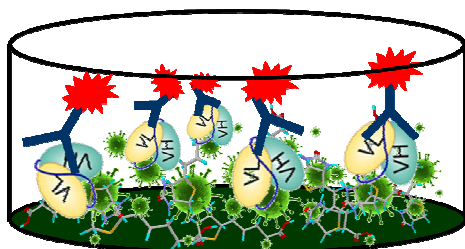


Abbildung 52: **Aufbau des ELISA-Tests zur Analyse der Bindungskapazität der einzelnen scFv-Fragmente.** Die Vertiefungen in der ELISA-Platte wurden mit 300ng Streptavidin beschichtet (grün dargestellt). Die biotinylierten viralen Partikel wurden über Streptavidin-Biotin Interaktion auf der Platte immobilisiert. Die Detektierung der spezifischen Bindung von scFv-Fragmenten an die Viruspartikel erfolgte in einem Photometer mittels anti-c-myc-HRP Antikörper (1:1000).

Die Bindungsspezifität ergab sich aus der Differenz der positiven und negativen Werte, wobei es sich bei den positiven Signalen um die Bindung der scFv-Fragmente an die pseudotypisierten LASV handelt. Als Negativkontrolle fungierten die immobilisierten MLV Partikel.

Wie aus dem Diagramm (Abb.: 53) hervorgeht, banden vier der 72 analysierten scFv-Fragmente spezifisch an die Lassa Viren, dementsprechend lagen die Absorptionswerte dieser Klone deutlich über dem cut-off (rote Linie). Die Klone D1 und G2 mit Messwerten von 1,4 und 1 zeigten die stärkste Bindung. Da der durchgeführte ELISA-Test aus mehreren aufeinander folgenden Schritten bestand (Abb.: 51), wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, um die Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten nachzuweisen (Abb.: 53). In erster Linie sollte die Expression der scFv-Fragmente detektiert werden, wobei zu diesem Zweck ein Klon mitgeführt wurde, dessen Phagemid das für murines Hühnereiweiß-Lysozym spezifische scFv-Antikörperfragment D1.3 kodiert (Hawkins, Russell et al. 1993).

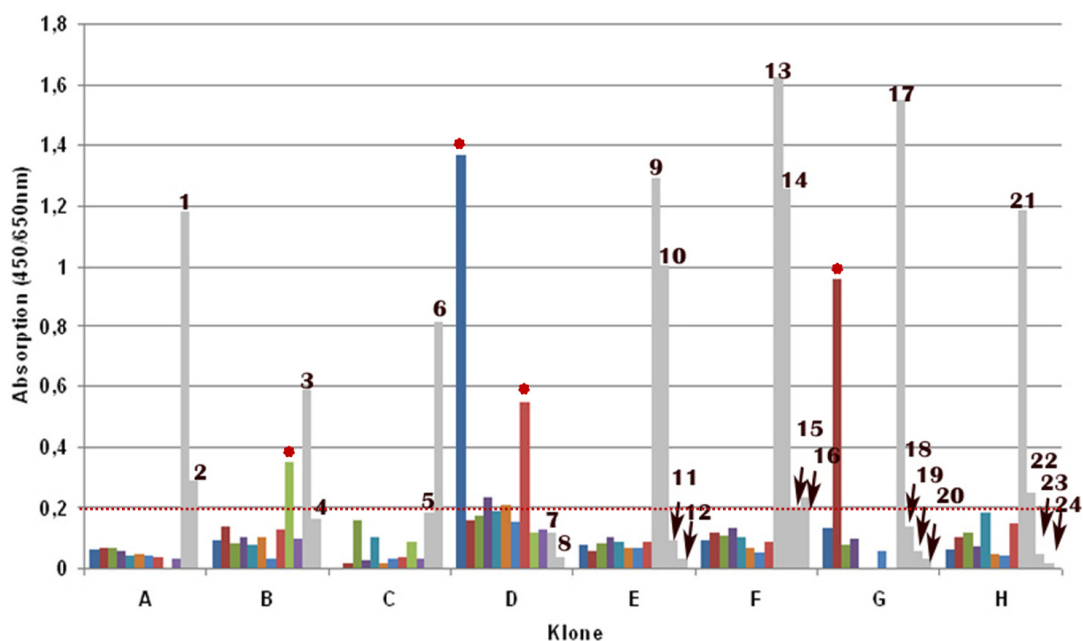


Abbildung 53: **Analyse der Bindungskapazität der selektierten scFv-Fragmente im ELISA-Test.** Die Detektion der spezifischen Bindung der scFv-Fragmente an die viralen Partikel erfolgte in einem Photometer mittels anti-c-myc-HRP AK (1:200). Die Bindungsspezifität ergab sich aus der Differenz der positiven (Bindung an LASV) und negativen Werte (Bindung an MLV). Graue Balken stellen die Kontrolle dar. 1: biot. LASV nachgewiesen mit Serum V (1:200); 2: biot. MLV mit Serum V; 3: biot. LASV detektiert mit anti-Lassa AV-Serum aus Kaninchen (1:400); 4: biot. MLV mit anti-Lassa AV Serum aus Kaninchen (1:400); 5: biot. LASV mit anti-MLV-Serum aus Ziege (1:400); 6: biot. MLV detektiert mit anti-MLV Serum aus Ziege (1:400); 7: biot. LASV mit neg. Serum aus Kaninchen; 8: biot. MLV mit neg. Serum aus Kaninchen (1:400); 9: biot. LASV detektiert mit Strep/HRP AK (1:200); 10: biot. MLV detektiert mit Strep/HRP AK (1:200); 11: biot. LASV mit anti-hum-HRP AK (1:1000); 12: biot. LASV mit anti-hum-HRP AK (1:1000); 13: scFv D1.3 detektiert mit anti-c-myc-HRP AK (LASV-Platte) (1:200); 14: scFv D1.3 detektiert mit anti-c-myc-HRP AK (MLV-Platte) (1:200); 15: biot. LASV mit anti-Ziege-HRP AK (1:400); 16: biot. MLV mit anti-Ziege-HRP AK (1:1000); 17: Nachweis des Lysozyms mit anti-Lysozym AK (LASV-Platte) (1:200); 18: anti-c-myc-HRP AK (LASV-Platte) (1:200); 19: biot. LASV mit anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 20: biot. MLV mit anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 21: Nachweis des Lysozyms mit anti-Lysozym AK (MLV-Platte) (1:200); 22: anti-c-myc-HRP AK (LASV-Platte) (1:200); 23: biot. LASV mit anti-c-myc-HRP AK (LASV-Platte) (1:200); 24: biot. MLV mit anti-c-myc-HRP AK (MLV-Platte) (1:200).



Dieser Klon wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Dübel zur Verfügung gestellt. Der bakterielle scFv-haltige Überstand wurde mit auf den Platten gebundenem Lysozym inkubiert und die Bindung mit anti-c-myc-HRP Antikörpern nachgewiesen (Abb.: 53; Proben 13 und 17). Des Weiteren wurde die Kopplung von Viren auf die mit Streptavidin beschichteten Platten sowohl mithilfe von Biotin/HRP-konjugierten Antikörpern (Proben 9, 10) als auch mit Patienten Serum V (für LASV) bzw. anti-MLV Serum (für MLV) kontrolliert (Proben 2, 6).

Zusätzlich wurden die sekundären Antikörper einzeln auf den Platten getestet, um zum einen falsch positive Signale zu vermeiden und zum anderen, um den Hintergrund subtrahieren zu können. Wie erwartet, ergaben sich schwache Hintergrundsignale von 0,24 bei der Immunfärbung mit verschiedenen Seren. Diese Werte wurden entsprechend bei der Berechnung der positiven Absorption berücksichtigt und von den positiven Werten subtrahiert.

Darüber hinaus wurden die gleichen 72 Klone mit den auf der ELISA-Platte gebundenen, in HEK 293H Zellen exprimierten, löslichen  $\Delta$ GP1-Proteinen getestet, wobei als negative Kontrolle der Zellüberstand aus nicht transfizierten HEK 293H Zellen diente (Abb.: 54)

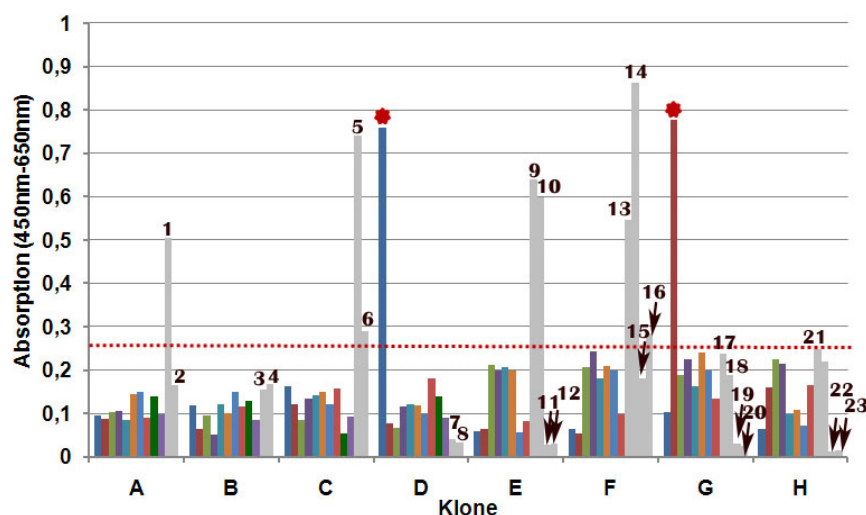


Abbildung 54: **Analyse der Bindungskapazität der selektierten scFv-Fragmente an GP1 im ELISA-Test.** Die Detektion der spezifischen Bindung der scFv-Fragmente an Glykoproteine 1 erfolgte in einem Photometer mittels anti-c-myc-HRP AK(1:200). Die Bindungsspezifität ergab sich aus der Differenz der positiven (Bindung an GP1) und negativen Werte (Bindung an neg. Zellüberstand). Graue Balken stellen die Kontrollen dar. 1: GP1 nachgewiesen mit Serum V (1:200) und anti-hum-HRP AK (1:1000); 2: neg. Zellüberstand inkubiert mit Serum V und anti-hum-HRP AK (1:1000); 3: GP1 inkubiert mit LASV-neg. Serum (1:400) aus Kaninchen und anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 4: Neg. Zellüberstand inkubiert mit LASV mit neg. Serum (1:400) aus Kaninchen und anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 5: GP1 nachgewiesen mit anti-LASV AV Serum aus Kaninchen (1:400) und anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 6: Neg. Zellüberstand nachgewiesen mit anti-LASV AV Serum aus Kaninchen (1:400) und anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 7: GP1 inkubiert mit anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 8: Neg. Zellüberstand inkubiert mit anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 9: scFv D1.3 detektiert mit anti-c-myc-HRP AK (1:200) (Platte 1); 10: scFv D1.3 detektiert mit anti-c-myc-HRP AK (1:200) (Platte 2); 11: Lysozym inkubiert mit anti-c-myc-HRP AK (1:200); 12: anti-c-myc-HRP AK (1:200); 13: Nachweis des Lysozyms mit anti-Lysozym AK (1:200) und anti-Ziege-HRP AK (1:1000) (Platte 1); 14: Nachweis des Lysozyms mit anti-Lysozym AK (1:200) und anti-Ziege-HRP AK (1:1000) (Platte 2); 15: anti-Lysozym AK (1:200); 16: anti-Ziege-HRP AK (1:1000); 17: anti-hum-HRP AK (1:1000); 18: anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 19: GP1 ungefärbt; 20: Neg. Zellüberstand ungefärbt; 21: GP1 inkubiert mit anti-c-myc-HRP AK (1:200); 22: Neg. Zellüberstand inkubiert mit anti-c-myc-HRP AK (1:200).



Zwei Klone erzielten Absorptionswerte von 0,78. Dabei handelte es sich bei beiden Bindern um die scFv-Fragmente, welche auch im ELISA-Test mit immobilisierten Lassa Partikeln die höchste Absorption aufwiesen (Abb.: 54). Dies deutet daraufhin, dass die beiden Antikörperfragmente das monomere GP1 erkennen. Die zwei weiteren im Virus-ELISA-Test detektierten scFv-Fragmente (B9 und D4) wurden beim zweiten Versuch nicht nachgewiesen, da diese möglicherweise an die Trimere binden.

### **3.6.3. Selektion und Analyse von LASV spezifischen scFv-Antikörperfragmenten aus der naiven Bibliothek HAL4/7**

Im Rahmen der Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Dübel wurden zusätzlich die in der Arbeitsgruppe hergestellte naive Bibliothek HAL4/7 gescreent, um weitere spezifische hochaffine Binder gegen LASV-Hüllproteine zu identifizieren. Die HAL4 Bibliothek besteht aus Phagen, welche Gene für scFv-Fragmente mit Kappa-Ketten tragen, während die HAL7 Phagen scFv-Gene des Lambda Isotyps enthalten. Diese Bibliothek zeichnet sich durch eine, mit 87% (HAL4) bzw. 89% (HAL7) vollständiger Antikörperfragmentgene, hohe Qualität aus und weist eine Diversität von  $5 \times 10^9$  Klonen auf (Michael Hust, persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zum oben beschriebenen Schema (Abb.: 52) wurden zur Selektion die LASV sowie MLV verwendet, welche direkt an der Nunc Maxi Sorb ELISA Platte immobilisiert wurden (zum Zeitpunkt des Versuches stand die Viren-Bindungsmethode über Streptavidin-Biotin noch nicht zur Verfügung).  $2 \times 10^7$  virale LASV und  $5 \times 10^5$  MLV Partikel wurden pro Well eingesetzt. Zuerst erfolgte eine negative Selektion, wobei 100  $\mu$ L (ca  $1 \times 10^{12}$  Phagen) HAL 4/7 Bibliothek 2 Stunden bei 4°C mit MLV inkubiert wurde. Der Überstand wurde für die Inkubation mit LASV Partikeln verwendet. Nach der positiven Selektion wurden die neu verpackten Phagen im Western Blot analysiert (Abb.: 55), wobei das native pIII Protein bei 62 kDa und das scFv::pIII Fusionsprotein bei 100 kDa detektiert wurden.

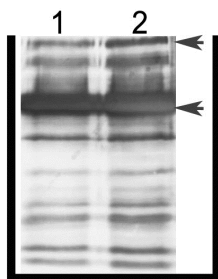


Abbildung 55: **Kontrolle der Phagenverpackung nach zwei Selektionsrunden im Western Blot.** 10  $\mu$ L der eluierten Phagen wurden mit  $\beta$ -Mercaptoethanol-Probenpuffer versetzt, denaturiert und in einem 10%igen SDS-Gell aufgetrennt. Nach dem Blotten erfolgte die Detektion der Proteine mit einem monoklonalen anti pIII AK aus Maus (1:2000) und einem mit AP gekoppelten anti-Maus AK aus Ziege (1:10000). Die Visualisierung wurde mit NBT und BCIP durchgeführt. Pfeile markieren bei 100 kDa die scFv::pIII Fusionsproteine und bei 62 kDa pIII Proteine ohne scFv-Fragmente; **1:** eluierte Phagen nach der ersten Selektion; **2:** eluierte Phagen nach der zweiten Selektion.

Die Stärke der Signale von pIII Proteinen im Gel deutet auf eine 1:2 bzw. 1:4 Verteilung der Fusions- bzw. WT-Hüllproteine auf der Phagenoberfläche hin.

Da die Diversität der Phagenpopulation nach der zweiten Runde bereits reduziert war, wurde die Stringenz der Kompetition verstärkt, indem die Anzahl der eingesetzten Phagen auf  $1 \times 10^{11}$  für die letzte Runde gesenkt und die Anzahl der Waschschrte erhöht wurde.

Nach der dritten Runde wurden die Klone entsprechend dem oben beschriebenen Schema gepickt, angezogen und die produzierten scFv-Fragmente im ELISA-Test analysiert. Als positives Target fungierten die an der Platte gebundenen löslichen GP1-Flag Konstrukte, während der Zellüberstand von nicht transfizierten HEK 293H Zellen als negative Kontrolle diente (Abb.: 56).

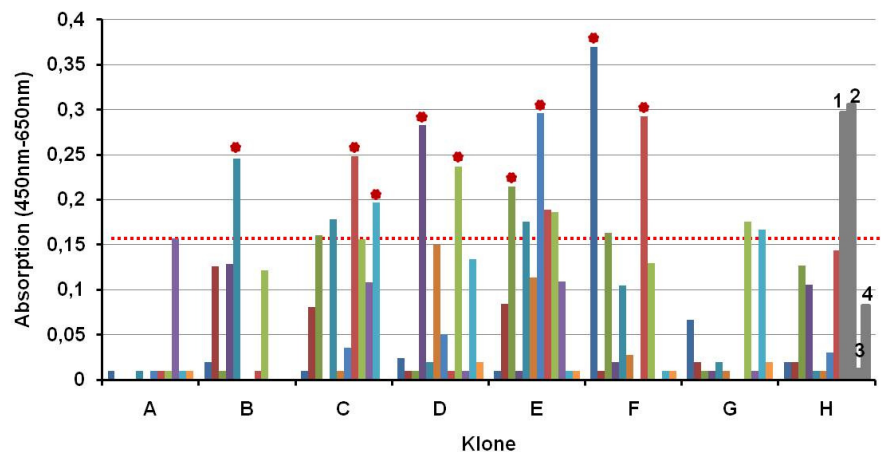


Abbildung 56: **Analyse der Bindungskapazität der selektierten scFv-Fragmente aus naiver Bibliothek im ELISA-Test.** Die Detektion der spezifischen Bindung der scFv-Fragmente an die Targets erfolgte in einem Photometer mittels anti-c-myc-HRP Antikörper (1:1000). Die Bindungsspezifität ergab sich aus der Differenz der positiven (Bindung an GP1) und negativen Werte (Bindung an neg. Überstand). Graue Balken stellen die Kontrollen dar. 1: GP1-Flag nachgewiesen mit Serum V (1:400) und anti-hum-HRP AK (1:1000); 2: GP1-Flag detektiert mit polyklon. anti-Flag AK aus Kaninchen (1:400) und anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 3: neg. Zellüberstand mit polyklon. anti-Flag AK (1:200) und anti-Kaninchen-HRP AK (1:1000); 4: neg. Zellüberstand mit Serum V (1:400) und anti-hum-HRP AK (1:1000).

Die Bindung der löslichen GP1-Flag Konstrukte wurde mittels Serum V sowie anti Flag Antikörpern detektiert (Proben 1 und 2). Die gemessenen Absorptionswerte fielen, im Vergleich zu den Vorversuchen aus dem Kapitel (3.3.7.), insgesamt sehr niedrig aus. was auf eine nicht ausreichende Konzentration des Proteins im Überstand zurückzuführen ist. Als positiv wurden die scFv-Fragmente betrachtet, deren Signale deutlich über dem cut-off von 0,15 lagen. Im weiteren Verlauf wurden 9 von 92 Klonen analysiert.

### 3.6.4. *Einzel ELISA-Test mit selektierten Klonen*

Um die Bindungskapazität der isolierten positiven Klone zu überprüfen wurde ein weiterer ELISA-Test durchgeführt. Hierfür dienten die pseudotypisierten LASV ( $1 \times 10^6$  pro Vertiefung) bzw. MLV Partikel ( $5 \times 10^4$  pro Vertiefung) als positives bzw. negatives Target. Die Viren wurden biotinyliert, wobei die Biotinylierungseffizienz im Durchflusszytometer kontrolliert wurde. Die scFv-haltigen Überstände wurden mit den auf einer ELISA-Platte immobilisierten Viren ca. 2 Stunden inkubiert.

Der Nachweis erfolgte mit anti-c-myc-HRP Antikörpern. Der Klon D1.3 wurde als negative Kontrolle mitgeführt (Abb.: 57).

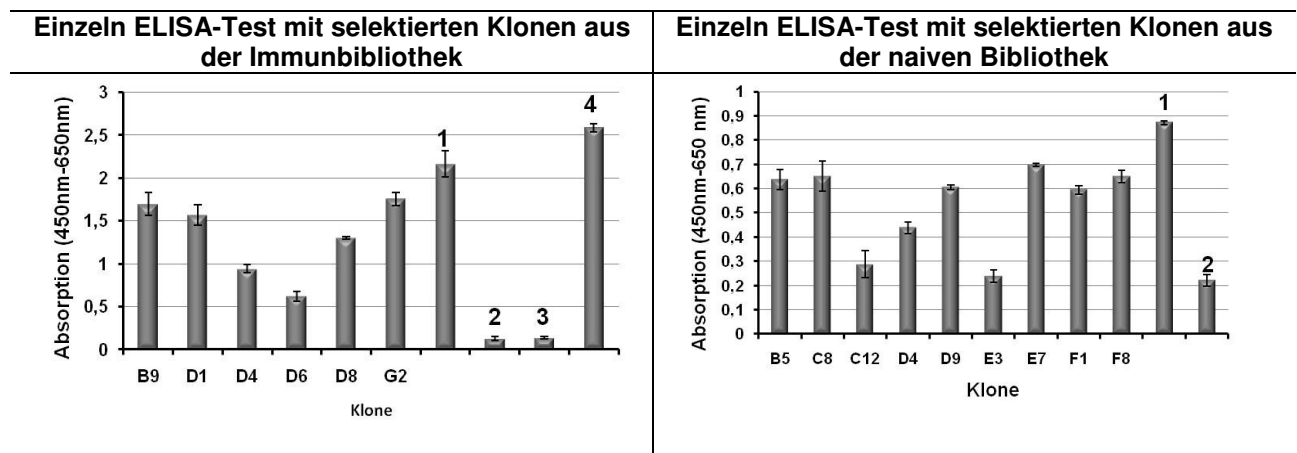


Abbildung 57: **Einzel-ELISA-Test mit selektierten LASV-GPC-positiven Klonen.** Die Detektion der spezifischen Bindung der scFv-Fragmente an die viralen Partikel erfolgte in einem Photometer mittels anti-c-myc-HRP- und Strep/HRP-Antikörper (1:1000). Die Bindungsspezifität ergab sich aus der Differenz der positiven (Bindung an LASV) und negativen Werte (Bindung an MLV). Positive Kontrollen **1:** scFv D1.3 detektiert mit anti-c-myc-HRP AK (1:1000); **2:** scFv D1.3 detektiert Strep/HRP-AK (1:200); **3:** biot. LASV detektiert mit anti-c-myc-HRP AK (1:1000); **4:** biot. LASV detektiert mit Strep/HRP-AK (1:200);

Der ELISA-Test wurde in Duplikaten durchgeführt. Auch in diesem Versuch reagierten vier aus der Immunbibliothek selektierte Klone spezifisch mit gebundenen Viren. Zwei weitere als Kontrolle mitgeführte scFv (D4 und D6) zeigten verglichen mit dem ersten Test höhere Absorptionswerte: 0,22 vs. 0,8 für D4 und 0,2 vs. 0,6 für D6. In weiterführenden Arbeiten sollen die beiden Klone näher analysiert werden.

Neun Klone aus der naiven Bibliothek, welche in ersten ELISA-Test über einen *cut-off* von 0,15 lagen, wurden in Duplikaten analysiert. Zu erwähnen ist, dass die Selektion dieser Klone auf den löslichen Glykoproteinen 1 erfolgte. In diesem Versuch wurden die pseudotypisierten biotinylierten Viren als Zielproteine eingesetzt. Interessant ist, dass sieben der neun Klone eine spezifische Bindung demonstrierten. Die Absorptionwerte dieser Klone lagen zwischen 0,6-07 und waren somit um das Dreifache höher als im ersten Test. Die Klone C12 und E3 zeigten keine spezifische Reaktion mit gebundenen Viren.

### 3.7. Analyse der isolierten spezifischen scFv-Fragmente

In den folgenden Versuchen werden die selektierten scFv-Fragmente untersucht, charakterisiert und miteinander verglichen.

### 3.7.1. Untersuchung der isolierten scFv-Fragmente in analytischem Gel

Zur Analyse der selektierten Klone wurden mit den Primern LacZ und M13 die Kolonie-PCR durchgeführt und die Produkte in analytischem Gel untersucht. Die Größe des Inserts aus den Klonen G2, B9, D4, D5, D6 betrug ca. 1100 bp, wobei als wichtig zu vermerken ist, dass die letzten drei Klone im ELISA-Test keine positive Absorption aufwiesen (Abb.: 58). In weiteren Versuchen, welche zur Analyse der Neutralisationskapazität der selektierten scFv-Fragmente dienten, wurden diese Klone ausschließlich als negative Kontrolle mitgeführt. Auffallend in der gelelektrophoretischen Analyse ist, dass zwei Klone D1 und D8 im Vergleich zu den anderen PCR-Produkten kürzer als die erwarteten 1100 bp waren. Auch Klon F8 aus der naiven Bibliothek wies ein kleineres Insert auf.

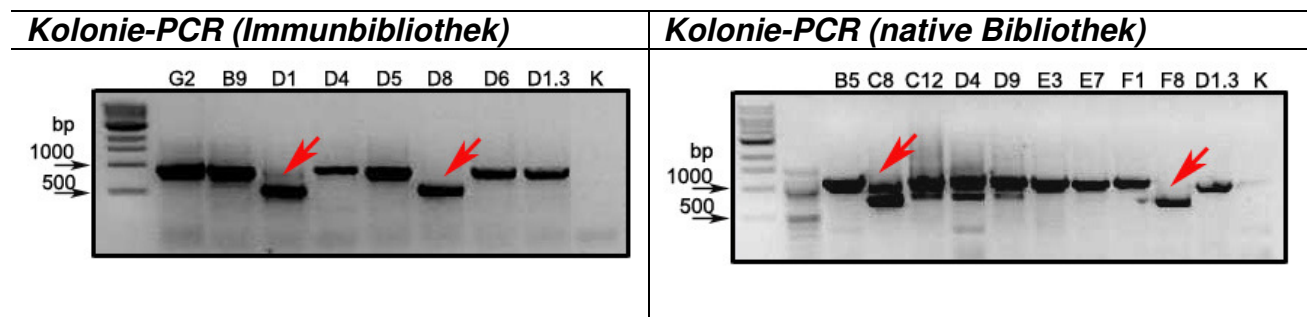


Abbildung 58: **Produktkontrolle einer Kolonie-PCR in 1%igen analytischem Agarosegel.** Die PCR-Produkte wurden mit den Primern lacZ und M96 pIII generiert. 5 µl PCR-Produkte wurden mit 6X Probenpuffer versetzt und in 1% Agarosegel bei 100 Volt, 30 min aufgetrennt. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte lagen bei 1100 bp. Rote Pfeile markieren Klone, deren Insert kleiner als 1100 bp war. Klon D1.3 diente als positive Kontrolle. K steht für negative Kontrolle (keine DNA). Als Größenstandard wurde der 1 kbp Marker von NEB benutzt. Die scFv-Fragmentnummerierung leitete sich von den Koordinaten der jeweiligen spezifischen ELISA-Tests ab.

Bei den Klonen C8, C12, D8 und D9 sind Doppelbanden zu sehen. Um die Herkunft dieser doppelten Fragmente nachvollziehen zu können, sind alle PCR-Produkte sequenziert worden.

### 3.7.2. Analyse der Neutralisationskapazität der selektierten scFv

Den bereits etablierten Neutralisationsassays liegt die Inkubation von Zellen mit den zu analysierenden scFv und entsprechenden Antigenen zu Grunde. Daher ist es wichtig die scFv-Fragmente für die Zellkulturarbeiten aufzureinigen. Dies erfolgt zum einen über die Aufreinigung des bakteriellen Überstandes über eine His-Säule. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass der effiziente Transport der scFv-Fragmente aus dem Periplasma in den Überstand bei den großen Mengen nicht gewährleistet werden kann, da handelsübliche Schüttler eine maximale Geschwindigkeit von 250 rpm erreichen. Bei der zweiten Methode handelt es sich um das Umklonieren des Fragmentes in einen neuen zur Transfektion von humanen Zellen geeigneten

Vektor. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass der Vektor bereits einen Fc-Teil aufweist. Die auf diese Weise produzierten scFv-Fc-Konstrukte zeigen eine 6x höhere Halbwertszeit im Vergleich zu scFv-Fragmenten (Holliger, Hudson et al. 2005). Zusätzlich wird durch die Produktion von Konstrukten in humanen Zellen die Glykosylierung der Fc-Domäne gewährleistet, was der nativen Situation im menschlichen Körper entspricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die selektierten scFv-Fragmente schnell und ohne zeitaufwendiges Klonieren auf ihre neutralisierenden Eigenschaften getestet, wobei der Reinheitsgrad der Antikörper für die nachstehenden Versuche mit den Zellen von entscheidender Bedeutung war. Zu diesem Zweck wurden zuerst die positiven Klonen in mehreren ELISA-Platten bei 1100 rpm angezogen, wobei der scFv-Transport aus dem Periplasma gewährleistet werden konnte. Das Endvolumen der jeweiligen scFv-haltigen Überstände belief sich auf 3 mL.

Das weitere Problem lag darin, dass die Zerfallprodukte der Bakterien, vor allem Endotoxine, in den Zellen zahlreiche physiologische Reaktionen auslösen, welche zu deren Tod führen. Die bakteriellen Endotoxine gehören zu den Pyrogenen und zeichnen sich durch ihre außergewöhnliche Stabilität aus. Um diese Stoffe aus den scFv-haltigen Überständen zu entfernen, wurden diese zuerst über einen 0,1 µm Filter steril filtriert und anschließend über eine Detoxi-Gel Endotoxin Säule der Firma Thermo Scientific aufgereinigt. Das eluierte Volumen betrug 2 mL. Um die neutralisierenden Eigenschaften der scFv-Fragmente zu analysieren, wurde 1 mL des aufgereinigten Überstandes für eine Stunde bei RT mit pseudotypisierten LASV Partikeln (MOI 0,1) inkubiert und zu  $2 \times 10^4$  TE 671 Zellen gegeben. 72 Stunden später wurde die Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen. Als negative Kontrolle diente der ebenso aufgereinigte Überstand des D1.3 Klonen. Da momentan keine neutralisierenden monoklonalen Antikörper zur Verfügung stehen, wurde als positive Kontrolle das Serum V (50 µL) verwendet, welches zu dem nicht aufgereinigten D1.3 Überstand beigemischt wurde. In einer anderen Probe wurde ein negatives Serum-Pool mit dem D1.3 Überstand gemischt. Anschließend wurden die beiden Proben nach dem oben beschriebenen Schema behandelt und über die Detoxi-Säule aufgereinigt. Zur Berechnung der Neutralisationskapazität wurde die unten stehende Formel verwendet:

$$\text{Neutralisationskapazität (\%)} = 100 - \frac{\text{Fluoreszenz (\%)} A \times 100}{\text{Fluoreszenz (\%)} B}$$

Dabei steht B für einen Fluoreszenzwert, welcher durch die Infektion der Zellen mit reinen Viren erzielt wurde, während A für einen Wert steht, welcher in einer Probe gemessen wurde, in der die für die Zellinfektion eingesetzten Viren mit einem scFv-haltigen Überstand präinkubiert wurden.

Die Neutralisationswerte von vier der 14 untersuchten Klone C8, D1, D8 und G2 lagen über 50% und zwei weitere Klone zeigten eine Neutralisation von ca. 45-48% (Abb.: 59).

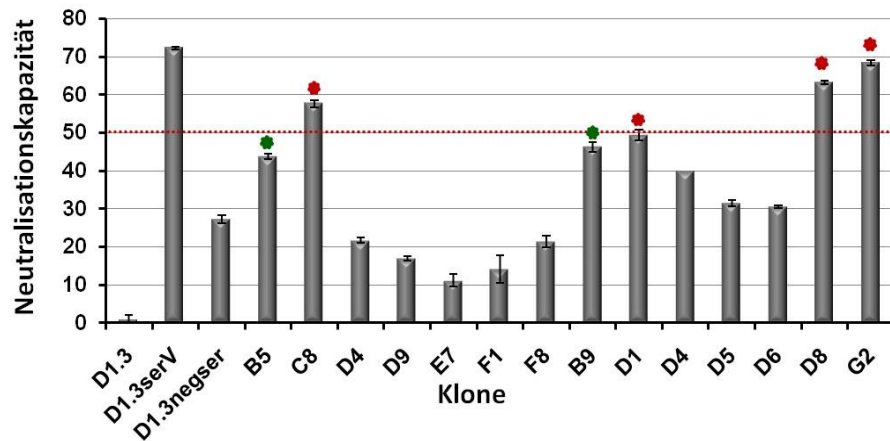


Abbildung 59: **Analyse der Neutralisationskapazität der selektierten scFv.** Aufgereinigte scFv-Überstände wurden mit LASV (MOI 0,1) 1 Stunde bei RT inkubiert und anschließend zu TE 671 Zellen gegeben. Nach 72 Stunden wurde die GFP-Fluoreszenz in den Zellen im Durchflusszytometer gemessen; **rot**: Klone mit einer Neutralisationskapazität über 50%; **grün**: Klone mit einer Neutralisationskapazität von ca. 45% (werden weiter getestet).

Da die Transduktionsrate bei diesem Versuch ca. 35% betrug wurden alle 6 Klone ein weiteres Mal in einem Neutralisationstest untersucht, wobei pseudotypisierte MLV Partikel als negative Kontrolle verwendet wurden (Abb.: 60).

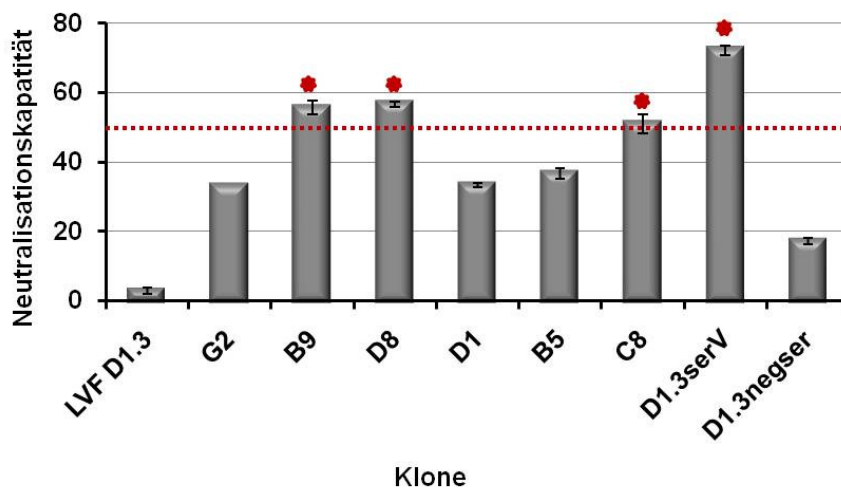


Abbildung 60: **Analyse der neutralisierenden Eigenschaften der sechs scFv-Fragmente.** Aufgereinigte scFv-Überstände wurden mit LASV bzw. MLV (MOI 0,1) 1 Stunde bei RT inkubiert und entsprechend auf die TE 671 sowie L929 Zellen gegeben. Nach 72 Stunden wurde das GFP Signal in den Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die als Hintergrund gesetzten Neutralisationswerte für MLV wurden bereits subtrahiert.

Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt, wobei aus den jeweiligen Doppel-Werten ein Mittelwert ermittelt wurde. Die Berechnung der Neutralisationskapazität erfolgte nach oben stehender Formel, wobei die negativen Werte (MLV-Neutralisation) von den positiven (LASV-Neutralisation) subtrahiert wurden. Auch in diesem Versuch wurden das Patientenserum sowie der LASV-GPC-negative Serum-Pool zu den D1.3 Überständen gemischt und als positive bzw. negative Kontrolle verwendet. Alle sechs scFv neutralisierten Lassa Partikel, allerdings reagierten

drei davon unspezifisch und zeigten eine 30%ige Neutralisation der MLV Partikel. Das Patientenserum im D1.3 Überstand zeigte bis zu 75% Neutralisation.

### 3.7.3. Untersuchung von Zytotoxizitätseigenschaften aus Bibliotheken selektierter Klone

Neben der Neutralisationskapazität der scFv-Fragmente sollten gleichzeitig Zytotoxizitätseigenschaften ausgeschlossen werden. Bei dem Zytotoxizitätstest wird die Protease Aktivität der toten Zellen gemessen, welche freigesetzt wird, wenn die Zellen ihre Membranintegrität verlieren.

Für dieses Assay wurden die scFv-haltigen Überstände, welche im ersten Neutralisationstest eine Aktivität zeigten, zu den TE 671 Zellen zugegeben und 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 100 µL der zellulären Überstände in eine für die Lumineszenzmessung geeignete ELISA-Platte überführt und nach der Zugabe von 100 µL des AAF-Glo Substrats die Zellvitalität gemessen (Abb.: 61). Als negative Kontrolle dienten die Überstände von den nicht behandelten Zellen, während die mit Digitonin getöteten Zellen als positive Kontrolle fungierten.

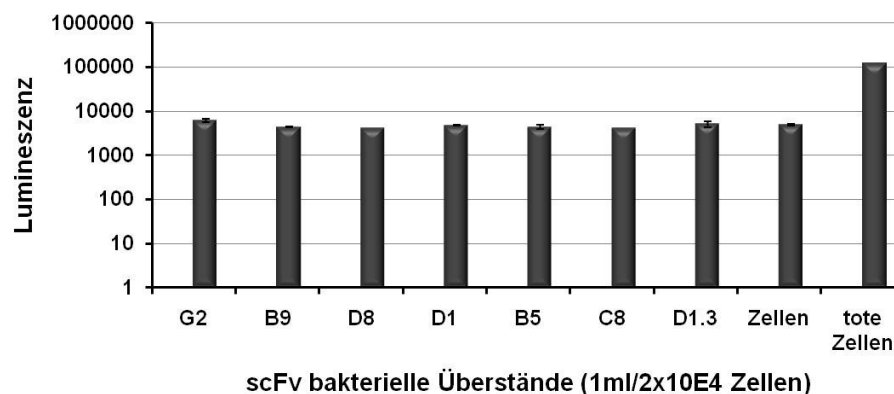


Abbildung 61: **Zytotoxizitätstest mit scFv-haltigen Überständen aus *E.coli* auf TE 671 Zellen.** Aufgereinigte scFv-Überstände wurden auf TE 671 gegeben. Nach 72 Stunden wurde die Lumineszenz im Luminometer gemessen. Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt.

Wie aus den abgebildeten Daten folgt, zeigten die aufgereinigten scFv-Überstände keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Die Lumineszenzwerte der behandelten sowie der unbehandelten Zellen lagen bei ca. 4000 LU. Die mit Digitonin behandelten Zellen erzeugten dagegen einen Wert von 120000 LU.

### 3.7.4. Western-Blot Analyse der selektierten scFv-Fragmente

Des Weiteren wurden die selektierten neutralisierenden scFv-Antikörperfragmente im Western Blot analysiert. Hierfür wurden die scFv-Überstände bzw. die aus den Überständen extrahierten Proteine, welche neutralisierende Eigenschaften aufwiesen, unter nicht-reduzierenden Bedingungen denaturiert und auf ein 10%-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung

wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Immunfärbung erfolgte mit anti-c-myc Antikörpern aus Maus und anti-Maus APC konjugierten Antikörpern (Abb.: 62). Als Kontrolle wurde anti-Lysozym scFv-Fragment D1.3 mitgeführt.

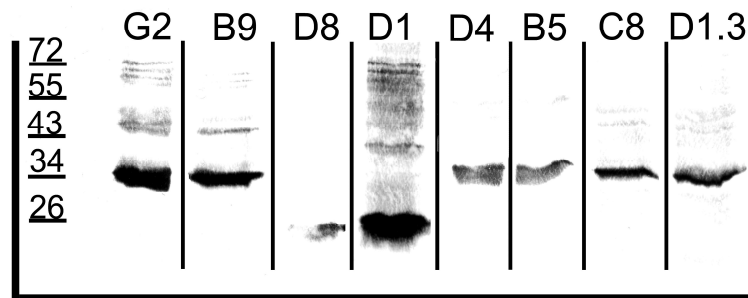


Abbildung 62: **Western Blot Analyse der isolierten scFv-Fragmente.** 50 µl scFv-Überstände wurden mit Probenpuffer versetzt und denaturiert. Nach Auftragen der Proben auf ein 10%-iges SDS Gel wurde ein „semidry-Blot“ durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit a-c-myc AK aus Maus (1:100) und a-Maus-APC AK (1:500)

Die theoretische molekulare Masse der produzierten scFv-Fragmente beträgt ca. 35 kDa. Die Klone G2, B9, D4, B5, C8 wiesen ein Fragment mit dieser Größe auf, während die Signale der D8 und D1 scFv erwartungsgemäß bei ca. 26 kDa lagen. Zur genaueren Analyse wurden die Inserts der positiven Klone sequenziert und miteinander verglichen.

### 3.7.5. Sequenzanalysen der isolierten scFv-Fragmente

Die Sequenzierung der aus den neutralisierenden Klonen isolierten DNA wurde mit den Primern LacZ (forward) und M13-96 (reverse) durchgeführt. Die Auswertung aller Sequenzdaten erfolgte mithilfe des „LaserGene“ Programmpakets, wobei zuerst entsprechende „Contigs“ erstellt wurden. Des Weiteren wurden die Nukleotidsequenzen translatiert, und die erhaltenen Aminosäuresequenzen mittels ClustalW ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)) verglichen. Die Ermittlung der CD-Regionen einzelner scFv-Fragmente erfolgte in der Antikörper-Datenbank für die Antikörper VBASE 2.

Im ersten Schritt wurden die bei dem Screening der Immunbibliothek erzeugten Sequenzen analysiert und verglichen (Abb: 63). Alle Klone verfügen über die Linker-Sequenz und einen HIS-Tag. Aus der Auswertung der vier positiven Klone ergaben sich drei unabhängige Sequenzen, da die Klone D1 und D8 eine gleiche Nukleotidabfolge aufwiesen. Erwartungsgemäß waren die Sequenzen der Klone D1 und D8 verglichen mit Klon G2 im Bereich der schweren Kette um ca. 110 Aminosäuren kürzer. Dies ist auf den Verlust der scFv-Gene für diese Bereiche zurückzuführen.



```

D1      MKYLLPTAAAGLLLLAAQP----AMQVQLQQSGAEVKKP----- 36
D8      MKYLLPTAAAGLLLLAAQP----AMQVQLQQSGAEVKKP----- 36
G2      MKYLLPTAAAGLLLLAAQP----AMQVQLQQSGGGLVKPGGTLRLSCVASGFTSSNYM 56
B9      MNCVRQAPGQGLEUWVANISPDGSGKSYVDSTRGRFTVSRD----- 40
          *: : :.. ** :* . . : * : :. : :

D1      -----
D8      -----
G2      SWIRQAPGKGLEUWVSISNTGGTVYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVY 116
B9      -----NSRDALYLQNNLRVEDTAMY 61

D1      -----KPEEGEFSEARVQAVVTQEPSTLVS 59
D8      -----KPEEGEFSEARVQAVVTQEPSTLVS 59
G2      YCARVRGIPAAAGTLDYWGRTLVTVSSASTKGPSVKLEEGEFSEARVSSELTQDPAVSVA 176
B9      YCAG-----WVGESNYWGQGLTVTVSSASTKGPSVKLEEGEFSEARVQAVLTQPPSASGT 116
          *****.. : ** * : :

D1      PGGTVTLTCGSTTGPVTNGHYPYWFQOKPGQAPRTL IYD TTKSSWTPARFSGSLLGGKS 119
D8      PGGTVTLTCGSTTGPVTNGHYPYWFQOKPGQAPRTL IYD TTKSSWTPARFSGSLLGGKS 119
G2      LGQTVRITCQ---GDSLRSYYASWYQOKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFSGSSSGNTA 233
B9      PGQRTVISCSGSTSSIGN-NYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSNSGNTA 175
          * * : : * . . * * : ** * * * : ** .. : . * * * * * * .. :

D1      ALTLTGAQPEDEADYYCLVYYN---DVGVSGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSAAAH 175
D8      ALTLTGAQPEDEADYYCLVYYN---DVGVSGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSAAAH 175
G2      SLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSG--NHLVFGGGTKLTVLRQPKAAPSVTLFPPSSAAAH 291
B9      TLTISRVEAGDEADYYCQWDMNGDHPHYVFGTGKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSAAAH 235
          : **: : .. : ***** . * * * : * * * * * : * : *****

D1      HHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA 197
D8      HHHHHGAAEQKLISEEDLNGA- 196
G2      HHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA 313
B9      HHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA 257
          *****

```

Abbildung 63: **Aminosäuren-Sequenzanalyse der vier positiven Klone aus der Immunbibliothek.** **Blau:** Linker-Sequenz KLEEGE; **Schwarz:** HIS-Tag; (\*)-kennzeichnet Homologien zwischen den Aminosäuresequenzen; (-)-kennzeichnet mögliche konservierte Substitutionen; (.)-kennzeichnet mögliche semi-konservierte Substitutionen; (-)-fehlende Aminosäuren.

Interessanterweise wiesen beide Klone D1 und D8 in ersten Neutralisationsassays neutralisierende Aktivität auf, allerdings reagierte D1 in einem wiederholten Versuch unspezifisch mit ML Viren, wodurch seine Neutralisationskapazität für Lassa Viren runterrevidiert wurde. In der Tabelle 15 sind die Sequenzen der Antikörperbindungsstellen vergleichend dargestellt.

Tabelle 15: **Vergleich der CD Regionen der drei unterschiedlichen Sequenzen.**

Klone	Schwere Kette	Leichte Kette
B9	----CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3----- ..... <b>ISPDGSGK</b> .. <b>AGV</b> <b>GESNY</b>	----CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3----- <b>TSSIGNNY</b> ..... <b>RNN</b> ..... <b>QVWDNNGDHPHYV</b>
D1/ D8	----CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3----- <b>TGPVTNGHY</b> ..... <b>DTT</b> ..... <b>LVYYNDVGVS</b> <b>GGG</b> <b>TKLTVL</b>	----CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3----- <b>TGPVTNGHY</b> ..... <b>DTT</b> ..... <b>LVYYNDVGVS</b> <b>GGG</b> <b>TKLTVL</b>
G2	----CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3----- <b>GFTSSNY</b> ..... <b>ISNTGGTV</b> .. <b>ARVRGIPAA</b> <b>GTLDY</b>	----CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3----- <b>SLRSYY</b> ..... <b>GKN</b> ..... <b>NSRDSSGNHIV</b>

Wie aus dem Vergleich folgt, verfügt der Klon B9 über keine CDR1 in der schweren Kette. Die CDRs aller drei Klone wiesen keine Homologie auf und unterscheiden sich vor allem in der Länge der CD 3 Regionen in beiden Ketten.

Des Weiteren wurden die Sequenzen der isolierten Fragmente über die Datenbanken VBASE 2 sowie IMGT in ihren jeweiligen V(D)J-Genen charakterisiert sowie die Homologien zu den in der Datenbank vorhandenen Genen festgestellt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 16 und 17 zusammengefasst.

Tabelle 16: **Genetische Analyse der aus der Immunbibliothek selektierten scFv-Sequenzen über VBASE 2 Datenbank.** **Grau:** V<sub>H</sub> Domäne, Weiss: V<sub>L</sub> Domäne. **Rot:** zwei identische Gene in den Klonen aus der Immunbibliothek; **Grün:** identische Gene in den Klonen aus den beiden Bibliotheken.

	V-Segment		D-Segment		J-Segment	
B9	Hum IgHV171	Hum IgLV130	X13972IGHD3-10*01	-	X86355 IGHJ4*02	X04457 IGLJ1*01
D1/D8	Hum IgHV245	Hum IgLV167	fehlt	-	fehlt	D87023 IGLJ3*02
G2	Hum IgHV175	Hum IgLV085	X13972 IGH6-13*01	-	X86355 IGHJ4*02	M15642 IGLJ3*01

Tabelle 17: **Genetische Analyse der aus der Immunbibliothek selektierten scFv-Sequenzen über die IMGT Datenbank.** **Grau:** V<sub>H</sub> Domäne, Weiss: V<sub>L</sub> Domäne. In den Klammern ist die Homologie in Prozenten angegeben. **Grün:** identische Gene in den Klonen aus der Immun- und der naiven Bibliotheken.

	V-Segment		D-Segment		J-Segment	
B9	IGHV3-7*01 F, or IGHV3-7*02 F (82%)	IGLV1-47*01 F or IGLV1-47*02 F (86%)	IGHD3-10*01 F1	-	IGHJ4*02 F (85%)	IGLJ1*01 F (100%)
D1/D8	IGHV1-69*11 F, or IGHV1-69*12 F or IGHV1-69*13 F or IGHV1-8*01 F or IGHV1-8*02 F (93%)	IGLV7-46*01 F (90%)	fehlt	-	fehlt	IGLJ3*02 F (94%)
G2	IGHV3-11*01 F (96%)	IGLV3-19*01 F	IGHD6-13*01 F	-	IGLJ2*01 F, or IGLJ3*01 F (94%)	IGHJ4*02 F (85%)

Wie aus den Tabellen hervorgeht, sind alle isolierten scFv human und gehen auf unterschiedliche Rekombinationsereignisse der entsprechenden V(D)J-Gene zurück. Eine Ausnahme ist laut der VBASE 2 Datenbank das Gen für das J-Segment der leichten variablen Domäne der Klone B9 und G2. Alle drei scFv besitzen eine VL Kette vom Typ lambda. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei drei von vier Klonen um unterschiedliche scFv-Fragmente handelt.

Da die Bindungskapazitäten der aus der naiven Bibliothek isolierten Klone relativ niedrig war, wurden hier nur die Sequenzanalysen der neutralisierenden Fragmente (Kapitel 3.6.2) durchgeführt, wobei die beiden DNA-Fragmente mit den Primern PelB (forward) und Myc (reverse) sequenziert wurden (Abb.: 64). Die Analyse ergab nur eine Konsensussequenz, welche als C8/B5 Klon bezeichnet wurde. Nach der Translation erfolgte ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der scFv-Fragmente aus der naiven und der Immunbibliothek. Wie Abbildung 64 zu entnehmen ist, unterscheidet sich zwar der Klon C8/B5 von den Klonen aus der Immunbibliothek, weist aber eine Homologie von bis zu 70% mit der leichten Kette des Klons D1/D8 auf.

```

C8.....·MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAQVQLVQSGR-----SLRLSCAASGFTFSSYAMHWVR·53¶
G2.....·MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAQVQLQSGGGGLVKPGGTLRSLSCVASGFTSSNYYSMSWIR·60¶
B9.....-----MNCVR·5¶
.....*.:*¶
¶
C8.....·QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAR·113¶
G2.....·QAPGKGLEWVSYISNTGGTVYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMSSLR AEDTAVYYCAR·120¶
B9.....·QAPGQGLEWVANISPDGSGKSYVDSTRGRFTVSRDNRDALY LQINNLRVEDTAMYYCAG·65¶
.....*****:*****:*.*.*.*.*.*.*.*:*****:*****:..*.*.*****:*****.¶
¶
C8.....·GGDVPAARSGMDVWGQGTITVTVSSGSASAP--KLEEGEFSEARVQAGLTQPPSVSVSPGQ·171¶
G2.....·VRGI PAAGT-LDYWGRGTLTVTVSSASTKGPSVKLEEGEFSEARVSSELTQDPAVSVALGQ·179¶
B9.....·WVGE-----SNYWGQGTITVTVSSASTKGPSVKLEEGEFSEARVQPVLTQPPSASGTPGQ·119¶
.....:*.*:*.*****:*.*.*.*****:*****:..*.*.*****:*****.¶
¶
C8.....·TASIPCSG--DALGSKYTYWYQQKPGQSP LLVIYQDTRKPSGIPERFSGSNSGNTATLT I·229¶
G2.....·TVRITCQG--DSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIY GKNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLT I·237¶
B9.....·RVTISCSGSTS SIGNNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSNSGNTATLT I·179¶
.....*.*.*.*.*:..*.*.*****:*.*:*.*:..*:*****:*.:*****:*****:***¶
¶
C8.....·SGTQAMDGADYYCQAWHS---YNAVFEGGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSAAAHNHNH·285¶
G2.....·TGAQAEDEADYYCNSRDSG--NHLVFGGT KLTVL RQPKAAPSVTLFPPSSAAAHNHNH·295¶
B9.....·SRVEAGDEADYYCQVWDNNGDHPHYVFGTGT KVTVLGQPKANPTVTLFPPSSAAAHNHNH·239¶
.....:..*:*.*****:..*.*.*:..*:*****:*.*:*****:*****:*****¶
¶
C8.....·HGAAEQKLI SEEDLN GAA·303¶
G2.....·HGAAEQKLI SEEDLN GAA·313¶
B9.....·HGAAEQKLI SEEDLN GAA·257¶
.....*****¶
¶
C8.....·MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAQVQLVQSGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGL·60¶
D1.....·MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAOVQLOO SG-----30¶
.....*****¶
¶
C8.....·EWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGGDVPA A·120¶
D1.....-----¶
.....¶
¶
C8.....·RSGMDVWGQGTITVTVSSGSASAPKLEEGEFSEARVQAGLTQPPSVSVSPGQTASIPC---177¶
D1.....-----AEVKKPEEGEFSEARVQAVVTQEP SLTVSPGGT VTLT CGST·71¶
.....*.*.*****:*****:*****:*.*:..*.*.¶
¶
C8.....·SGDALGSKYTYWYQQKPGQSP LLVIYQDTRKPSGIPERFSGSNSGNTATLT ISGTQAMDG·237¶
D1.....·TGPVTNGHYFYWFQQKPGQAPRTL IYDTTKKSSWTPARFSGSLLGGKSALT LTGAQPEDE·131¶
.....*:..*:..*:*.*:*****:*.*:..*:..*:..*:*****:*.*:..*:..*:..*.¶
¶
C8.....·ADYYCQAWHSYNAVFEGGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSAAAHNHNH HGAAEQKLI SEE·297¶
D1.....·ADYYCLVYINDVGVSGGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSAAAHNHNH HGAAEQKLI SEE·191¶
.....*****:..*:..*.*****:*****:*****:*****:*****¶
¶
C8.....·DLNGAA·303¶
D1.....·DLNGA·196¶
.....*****¶

```

Abbildung 64: Aminosäuren-Sequenzvergleich der neutralisierenden Klone aus beiden Bibliotheken. **Blau:** Linker-Sequenz KLEEGE; **Schwarz:** HIS-Tag (\*)-kennzeichnet Homologien zwischen den Aminosäuresequenzen; (-)-kennzeichnet mögliche konservierte Substitutionen; (.)-kennzeichnet mögliche semi-konservierte Substitutionen; (-)-fehlende Aminosäuren.

Die Sequenz verfügt über einen Linker, ein HIS-Tag sowie vollständige V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> Regionen. Die Aminosäurenabfolge der Antigenbindungsstellen beide Ketten befindet sich in Tabelle 18.

Tabelle 18: **Antigenbindungsstellen des C8/B5 Klon**

Klon	Schwere Kette	Leichte Kette
C8/B5	-----CDR1-----> <--CDR2--> <-----CDR3----- GFTFSSYA...__ISYDGSNK...__ARGGDVPAARSGMDV	-----CDR1-----> <--CDR2--> <-----CDR3----- ALGSKY.....__QDT.....__QAWHSYNAY

Obwohl die C8 und B5 Klone gleiche Nukleotidensequenzen aufweisen, neutralisiert das B5 scFv-Fragment, wie auch im Fall mit D1 und D8 Klonen aus der Immunbibliothek, unspezifisch die ML Viren. Die Unterschiede zwischen den Neutralisationswerten für B5 und C8 Klone sind auf möglicherweise unterschiedliche Proteinmengen in den scFv-Überständen zurückzuführen.

Darüber hinaus wurde die Sequenz über die VBASE 2 und IMGT Datenbanken charakterisiert (Tab.: 19 und 20) und die Homologie zu den Genen in den Datenbanken festgestellt.

Tabelle 19: **Genetische Analyse der aus der naiven Bibliothek selektierten scFv-Sequenzen über VBASE 2 Datenbank.** **Grau:** V<sub>H</sub> Domäne, Weiss: V<sub>L</sub> Domäne. **Grün:** identische Gene in den Klonen aus den beiden Bibliotheken.

	V-Segment		D-Segment		J-Segment	
C8/B5	Hum IgHV047	HumIgLV104	M35648 IGHD2-2*03	-	X86355 GHJ6*02	M15642 IGLJ3*01

Tabelle 20: **Genetische Analyse der aus der naiven Bibliothek selektierten scFv-Sequenzen über IMGT Datenbank.** **Grau:** V<sub>H</sub> Domäne, Weiss: V<sub>L</sub> Domäne. In den Klammern ist die Homologie prozentual angegeben. **Grün:** identische Gene in den Klonen aus den beiden Bibliotheken.

	V-Segment		D-Segment		J-Segment	
C8/B5	IGHV3-30-3*01 (99%)	IGLV3-1*01 F (92%)	IGHD2-2*01 F	-	IGHJ6*02 F (77%)	IGLJ2*01 F, IGLJ3*01 F, IGLJ3*02 F (94%)

Auch bei dem Klon C8/B5 handelt es sich um einen humanen Antikörper. Entsprechend der Erwartungen ergab sich laut IMGT Datenbank eine Übereinstimmung mit dem Klon D1/D8 im Genallel des J-Segmentes der leichten Kette und laut VBASE 2 Datenbank – mit dem Klon G2.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Klinische Daten des Lassa Fieber Patienten**

Die klinischen Daten des Lassa Fieber Patienten wurden uns vom Klinikum der Goethe Universitäts zur Verfügung gestellt. Der Patient wurde ab der dritten Krankheitswoche mit Ribavirin behandelt und überlebte die LASV-Infektion. Die im Rahmen der Arbeit gemessenen Antikörpertiter in den Patientenproben wurden mit den bereits vorliegenden Daten der Universitätsklinik in Frankfurt am Main (Dr. S. Schilling) bzw. des Bernhard-Nocht-Instituts im Hamburg (Prof. Dr. S. Günther) abgeglichen und bestätigt.

Der Patient zeigte zum Zeitpunkt seiner Einlieferung klassische Symptome einer Lassa Fieber Infektion, kurze Zeit später wurde die Diagnose mittels LASV-RT-PCR bestätigt. Die Aspartat-Aminotransferase (AST) sowie die AST/Alanin-Aminotransferase (ALA) Werte waren stark erhöht ( $> 150$  U/L), was auf eine Infektion der Leber hindeutete (Charrel, Coutard et al.). Tatsächlich können Lassa Fieber Viren aufgrund ihres breiten Tropismus verschiedene Organe, wie Leber, Niere und Herz befallen (Hensley, Smith et al.). Der Krankheitsverlauf zeichnete sich durch eine hohe Virämie aus, wobei die im PCR-Verfahren ermittelte Viruslast  $10^{3.6}$  kop/ml betrug. Dabei ist zu betonen, dass der hohe Virustiter im Serum sehr stark mit dem Sterberisiko korreliert, da die virale Replikation in die pathophysiologischen Prozesse eingebunden ist (Weidmann, Sall et al.).

Die Untersuchungen der TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Spiegel sowie der Sekretion der pro-inflammatorischen Interleukine wie IL-1b, IL-2, IL-6, IL-10, IL-8, IL-12 und der ko-stimulierenden Moleküle wie CD40, CD80, CD86 (Mahanty, Bausch et al. 2001 ) wurden bei dem Patienten nicht durchgeführt. Die Synthese bzw. die Freisetzung dieser Mediatoren korreliert mit einer fatalen Infektion bzw. mit ihrer Überlebenschancen (Schmitz, Kohler et al. 2002). Aufgrund des Fehlens dieser Daten konnten keine vergleichenden Analysen mit anderen Fällen durchgeführt bzw. keine Prognose erstellt werden.

Der klinische Verlauf des Lassa Hämorrhagischen Fiebers zeichnet sich durch eine, verglichen mit anderen viralen Erkrankungen, späte und relativ schwache humorale Immunantwort aus (Waffarn and Baumgarth 2011). Die Immunoglobuline M können zwar in der zweiten bzw. dritten Krankheitswoche nachgewiesen werden, sind allerdings gegen NP bzw. Z Proteine gerichtet und können das Virus nicht neutralisieren. Die neutralisierenden IgG werden hingegen erst eins bis drei Monate nach der Erkrankung gebildet und zeichnen sich durch einen niedrigen Titer aus (McCormick and Fisher-Hoch 2002). Interessant ist, dass das Auftreten von spezifischen IgM- und IgG Antikörpern in Patienten und infizierten Affen nicht mit der Genesung oder der Virämie korreliert (Fisher-Hoch and McCormick 2004). Dennoch belegen viele in West Afrika durchgeführte Untersuchungen die Bedeutung der humoralen Antwort für den langfristigen Schutz der Bevölkerung. Die Prävalenz der LASV spezifischen Antikörper in der humanen Population in den endemischen Regionen ist sehr hoch und erreicht in Ländern wie Sierra Leone,

Nigeria und Guinea bei Erwachsenen bis zu 50% (McCormick, Webb et al. 1987; Kunz 2009). Einige longitudinale Studien in Sierra Leone offenbaren ein hohes Vorkommen von Lassa spezifischer Serokonversion (bis zu 20% pro Jahr) in anfälligen (Antikörper negativen) Personen. In Übereinstimmung mit der hohen Seroprävalenz bei den Einheimischen dient dies als Hinweis auf einen milden und asymptomatischen Verlauf der Infektion. Angenommen wird, dass es sich bei dem Großteil dieser asymptomatischen Serokonversionen um eine Reinfektion handelt, wobei die Betroffenen bereits Teil-Immunität gegen das tödliche Virus entwickelt haben (Gunther, Kuhle et al. 2001). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass frühere Infektionen zur Generierung der Lassa spezifischen Antikörper beigetragen haben (Zu Übersicht (Gunther and Lenz 2004)). Angesichts hoher Seroprävalenz verwundert die relativ niedrige Sterbensrate aufgrund einer LASV-Infektion bei der endemischen Bevölkerung (1-2% der Erkrankten) nicht. Diese Studien und Beobachtungen demonstrieren deutlich die protektive Rolle neutralisierender Antikörper im Schutz gegen dieses hochpathogene Virus.

Im Fall des Patienten aus Frankfurt am Main wird ebenso angenommen, dass es sich bei der Erkrankung um eine Reinfektion handelte. Der Grund dafür war, dass der Erkrankte Lassa Fieber Virus spezifische Antikörper bereits in den ersten Wochen der Infektion aufwies (Daten von Dr. S. Schilling). Auch die Tatsache, dass der Patient die Erkrankung überwunden hat, wobei viele Indizien, wie das fortgeschrittene Alter des Patienten, eine weitere schwere virale Infektion zu dem gleichen Zeitpunkt auf einen letalen Ausgang hindeuteten, spricht dafür.

Die Titer für bindende bzw. neutralisierende Antikörper im Patientenserum korrelierten mit den aus der Literatur bekannten Werten (Palacios, Druce et al. 2008). Der höchste IgG-Titer der neutralisierenden Antikörper (IC<sub>50</sub>: 25) entwickelte sich sieben Monate nach der Erkrankung und wurde klassischerweise noch vier Jahre im Körper aufrecht erhalten. Die bindenden Antikörper, darunter auch IgM, traten bereits in den ersten zwei Wochen auf, wobei eine halbmaximale Bindung bei einer Serumverdünnung von 1:500 erreicht wurde. Die erneute Messung nach sieben Monaten ergab eine Erhöhung des Titers (halbmaximale Bindung bei 1300). Dieser Wert blieb ebenfalls über die nächsten vier Jahre konstant.

Das späte Erscheinen der neutralisierenden Antikörper ist im Wesentlichen auf virale Antigene zurückzuführen. Dabei weisen sich die viralen Glykoproteine als der limitierende Faktor für Antikörperentwicklung aus. Die hohe GP-Dichte und der damit assoziierte Glykan-Schutzschild sowie die GP-konformellen Epitope stellen die molekularen Mechanismen dar, welche eine effektive Antikörper-vermittelte Virusneutralisation erschweren (Pinschewer, Perez et al. 2004).

Der zweite Grund für die Suppression der Antikörperproduktion besteht darin, dass die B-Zellen nicht über Antigen-präsentierende Zellen aktiviert werden können, da Letztere durch den immunpathologischen Einfluss der virus-spezifischen CD8-T-Zellen (Recher, Lang et al. 2004), der CD4/CD25 regulatorischen T-Zellen (Lim, Hillsamer et al. 2005) und der CD4 Helferzellen (Bergthaler, Flatz et al. 2009) in ihrer Funktion beeinträchtigt sind (Planz, Seiler et al. 1996). Die

Destruktion von Makrophagen und Dendritischen Zellen erfolgt in der Marginalzone der Milz und der Lymphknoten durch die Freisetzung von TNF- $\alpha$ , interleukin 10 und *transforming growth factor* A (Odermatt, Eppler et al. 1991).

## **4.2. Herstellung von Phagen-Bibliotheken**

Es existieren verschiedene Methoden zur Herstellung einer Phagen-Bibliothek. Die Immunbibliotheken werden meistens in einem „zwei Schritte“ Klonierungsverfahren oder durch Assembly-PCR Technik erzeugt. Als Vorlage dient die in cDNA umgeschriebene RNA, welche, je nach Zielsetzung, aus verschiedenen Zelltypen (PBMCs, Knochenmark, Milz) isoliert wird. Dabei ist zu beachten, dass das Gen-Repertoire der leichten Kette im ersten Schritt kloniert werden soll. Erst dann werden die Gene der schweren Kette eingefügt, da diese durch ihre sehr variable CDRH3 Region wesentlich mehr zur Diversität einer Bibliothek beitragen (Little, Welschof et al. 1999). Bei der so genannten Assembly-PCR werden beide Ketten separat amplifiziert, über einen PCR-Schritt miteinander verbunden und erst dann in einen Vektor kloniert. Oft wird die Assembly-PCR mit einer Ramdominisierung der CDR3 Regionen kombiniert (Akamatsu, Cole et al. 1993). Die Diversität einer Immunbibliothek soll im Bereich von  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^7$  Klonen liegen und ist damit ausreichend, um spezifische Antikörper selektieren zu können.

Die Herausforderung bei der Konstruktion einer naiven Bibliothek liegt in der Gewährleistung der genetischen Diversität durch das mehrfache Transformieren der *E.coli* Bakterien bei gleichzeitiger Wahrung der genetischen Stabilität. Mit den heutigen Methoden lassen sich naive Bibliotheken mit einer Diversität von  $10^{10}$  Klonen erzeugen. Diese hohe Klonvielfalt ist notwendig um das Arsenal von  $10^{10}$  Antikörpern des menschlichen Organismus abzudecken und um Immunoglobuline mit einer Affinität im nanomolaren Bereich zu erzeugen (Hust and Dubel 2004). Die Auswahl der Bibliothek für die Gewinnung von Antikörpern hängt stark vom Anwendungsgebiet und der gewünschten Affinität des gesuchten Antikörpers ab. (Hoogenboom 2005). Während naive Bibliotheken mit ihrer hohen Diversität sehr oft in Kombination mit Hochdurchsatz-Screenings eingesetzt werden, wodurch Antikörper gegen beliebige Antigene erzeugt werden können (Hoet, Cohen et al. 2005; Knappik, Ge et al. 2000), dienen die Immunbibliotheken meistens der Gewinnung von Antikörpern mit seltener Spezifität und besonders interessanten Eigenschaften. So konnte aus einer Immunbibliothek ein Antikörper gewonnen werden, welcher in der Lage war, den trimolekularen Komplex aus HIV 1 Protein GP120 (Stamm JR-FL) und den beiden Rezeptoren CD4 sowie CCR5 zu erkennen und zu inhibieren. Der Antikörper wies zudem eine gewünschte Affinität im nanomolaren Bereich gegenüber den Hüllproteinen aus anderen HIV Stämmen auf. Die verwendete Immunbibliothek wurde von einem seropositiven Donor mit hohem Titer an breit neutralisierenden Antikörpern abgeleitet (Moulard, Phogat et al. 2002). Ein weiteres Beispiel einer erfolgreichen Antikörperselektion aus einer Immunbibliothek wurde in einem gemeinsamen Projekt der Firma



Crucell (Niederlande) und dem CDC (USA) publiziert. Im Rahmen dieser Zusammenarbeit wurde eine Phagen-Immunbibliothek aus dem Genrepertoire eines gegen Rabiesvirus (Tollwutvirus) schutzgeimpften Donors generiert, aus welcher anschließend 147 bindende, darunter 39 Virus-neutralisierende Antikörperfragmente, isoliert wurden (Kramer, Marissen et al. 2005).

Die Entscheidung, eine Immunbibliothek aus dem an Lassa Fieber erkrankten Spender zu generieren, beruhte auf der Begebenheit, dass der Patient die tödliche Infektion überlebte und in den nachfolgenden Jahren eine stabile humorale Antwort entwickelte. Der Titer der neutralisierenden Antikörper mit einem IC<sub>50</sub> Wert von 30 war zwar relativ gering, konnte aber über 4 Jahre aufrechterhalten werden. Dies deutet auf eine Zirkulation der spezifischen Plasmazellen und B-Lymphozyten in der peripheren Blutbahn hin. Um einen größeren Pool an B-Gedächtnis- bzw. Plasmazellen zu erfassen, werden vor allem bei immunisierten Tieren die Bibliotheken aus Knochenmarkzellen bzw. Lymphorganen hergestellt (de Carvalho Nicacio, Williamson et al. 2002). Wie bereits erwähnt, sind die Größe und die Vielfalt einer Bibliothek in Bezug auf Qualität und Erfolg des nachfolgenden Biopannings ausschlaggebend. Die im Rahmen dieser Arbeit generierte Immunbibliothek wies für die beiden leichten Ketten  $\lambda$  und  $\kappa$  eine Diversität von  $2 \times 10^7$  Klonen auf. Dieser Titer befindet sich im oberen Bereich der für Immunbibliotheken vorgegebenen Maße ( $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  Klone). Die Analyse der zufällig ausgewählten Klone offenbarte, dass beide Ketten mit dem Vektor pHAL 14 fusioniert wurden, wobei der Anteil vollständiger Antikörperfragmente bei ca. 88% liegt, was auf eine hohe Qualität der generierten Immunbibliothek hinweist. Die Anzahl der verpackten Phagen befand sich im Bereich von  $1 \times 10^{11}$  bis  $5 \times 10^{11}$ . Dieser Wert lag unter dem der naiven Bibliothek HAL4/7 und konnte durch wiederholte Verpackungen nicht verbessert werden. Dies und das verlangsamte Wachstum der mit Phagen infizierten Bakterien deutet darauf hin, dass die in Phagemiden befindlichen Gene einen negativen Einfluss auf den bakteriellen Stoffwechsel ausüben. Dennoch konnte durch den Einsatz von ca. 500  $\mu$ L Probe aus der Bibliothek in jeder Runde bei der Selektion die volle Diversität abgedeckt werden.

### ***4.3. Produktion und Immobilisierung von Zielproteinen für das Biopanning***

Für eine erfolgreiche Selektion der spezifisch bindenden Liganden während des Biopannings spielt die richtige Auswahl des Targets eine entscheidende Rolle. Dabei sollen die viralen Proteine sowie ganze Viruspartikel möglichst in einer intakten nativen Form vorliegen. Wie bereits erwähnt (Kap. 1.1.2.1.), befinden sich auf der Oberfläche eines Lassa Virions bis zu 1500 Glykoprotein-Spikes, welche die wichtigste Determinante für die Aktivierung des Immunsystems darstellen. Diese Glykoproteine zeichnen sich jedoch durch eine sehr starke Glykosylierung aus, welche zur Entstehung eines Glykan-Schutzschildes führt (Eschli, Quirin et al. 2006). Die



Prozessierung, Reifung sowie Interaktionen dieser Proteine mit Zellmembran sind noch nicht ausreichend untersucht. Daher ist zurzeit kein Expressionssystem für LASV-GP etabliert. Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass die Lassa Viren nur unter strengen gentechnischen Sicherheitsstufen (S4) zu handhaben sind. Daher wurden für die Produktion von Zielproteinen für das Biopanning im Laufe dieser Arbeit zwei verschiedene Ansätze entwickelt. Da das virale Glykoprotein das primäre Ziel für neutralisierende Antikörper darstellt, wurden zum einen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. S. Kunz eine Methode etabliert, um ein lösliches Glykoprotein 1 Monomer in humanen Zellen herzustellen. Zum anderen wurde ein System zur Herstellung nicht replikationsfähiger pseudotypisierter Viren angewendet, welches es ermöglicht, die viralen Partikel mit nativen dimeren GP-Spikes auf ihrer Oberfläche zu erzeugen.

#### **4.3.1. Expression löslicher Glykoproteine 1**

Das klassische Target für die Selektion spezifischer Antikörper stellen lösliche virale Proteine dar, welche in Mammalia-Zellen produziert und anschließend aufgereinigt werden. So konnten lösliche trimere HIV Env Proteine in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. U. Dietrich exprimiert werden, mit denen Trimer-spezifische Antikörper selektiert werden konnten (Maria Hertje, in Vorbereitung).

Bereits seit den späten 80er Jahren konnte die HIV Proteinexpression in Mammalia- Zellen etabliert (Berman, Nunes et al. 1988; Berman, Riddle et al. 1989) und die Auswirkung von verschiedenen Mutationen (Earl, Koenig et al. 1991) auf die Antikörperbildung untersucht werden (Earl, Broder et al. 1994). Die schnellen Erfolge in der Produktion viraler Proteine sind auf die intensive Erforschung der Biologie des HI Virus zurückzuführen. Auch lösliche Influenza Proteine konnten erfolgreich exprimiert werden (Nayak, Davis et al. 1985; Khurana, Larkin et al. 2011).

Anders als beim Lassa Fieber Virus werden die Untersuchungen in Bereichen HIV und Influenza durch die ständig drohenden Pandemien intensiviert. Erst mit zunehmender Globalisierung sowie einer stark erhöhten individuellen Mobilität stieg das öffentliche Interesse für das hämorrhagische Fieber auslösende Lassa Virus. Daher werden momentan aktiv Wege zur Untersuchung viraler Antigene gesucht und etabliert. Einige LASV-Proteine, wie Nukleoprotein, konnten bereits erfolgreich in Bakterien in großen Mengen exprimiert werden (Clegg, Barber et al. 1986; Barber, Clegg et al. 1987). Allerdings konnte gezeigt werden, dass dieses klassische Expressionssystem zur Herstellung von Lassa GP nicht geeignet ist, da die Bakterien nicht in der Lage sind, die Proteine zu glykosylieren (Branco, Matschiner et al. 2008). Somit kann die wichtigste Voraussetzung für ein Target: seine native Form, nicht erfüllt werden. Zudem wurde demonstriert, dass die in *E.coli* exprimierten Influenza Hämagglutinin Proteine sich von den nativen viralen Oberflächenproteinen unterscheiden und durch die neutralisierenden Antikörper nicht erkannt werden (Nayak, Davis et al. 1985; Bosch, Bodewes et al. 2010). Daher wird zurzeit versucht, verschiedene weitere Wirts-Modelle, wie Insekten oder Mammalia-Zellen, für die Lassa

GPC Produktion zu etablieren. Dabei stößt man auf einige Schwierigkeiten, da die Lassa GPC Expressions- und Sekretionswege derzeit unvollständig aufgeklärt sind (Agnihothram, York et al. 2006; Schlie, Maisa et al. 2010). Die ersten Versuche, die Proteine in Insektenzellen (*Drosophila melanogaster*) zu exprimieren, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Garten (Marburg) unternommen. Bei dieser Methode wurde zwar die Glykosylierung von Proteinen gewährleistet, es gelang jedoch dabei nur, die GP2 Ektodomäne zu exprimieren (Lennartz et al., 2007, Poster). Aufgrund einer geringeren Ausbeute galt die Expression viraler Glykoproteine in Mammalia-Zellen bis vor kurzem als sehr zeit- und kostenaufwendig. Erst durch die Entwicklung verschiedener Konstrukte mit einer Aminosäurendeletion am N-Terminus des Glykoproteins 1 konnte die Proteinausbeute bei der Produktion in humanen Zellen enorm gesteigert werden (Illick, Branco et al. 2008; Branco and Garry 2009). Auch für weitere Vertreter der Arenaviren konnten in Anlehnung an dieses Verfahren einige Erfolge bei der Herstellung löslicher GP1 in humanen Zellen erzielt werden (Bowden, Crispin et al. 2009; Radoshitzky, et al., 2010, Poster). Der Expressionsspiegel ganzer nativer GPC-Monomere sowie GPC-Trimere ist nach wie vor sehr niedrig und reicht nicht aus um eine für ein Screening ausreichende Menge an Proteinen zu erzeugen. Die löslichen viralen Glykoproteine I zeichnen sich durch eine hohe Bindungskapazität aus und können, wie im Fall anderer viraler Proteine (GP140 von HIV), direkt oder durch die in die Konstrukte eingefügten Tags an diverse Träger gebunden werden. Da sowohl für HIV als auch für Influenza die entscheidende Rolle der intakten Oberflächeproteine für die Erzeugung der neutralisierenden Antikörper demonstriert wurde (Bosch, Bodewes et al. 2011), wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Technik eingesetzt, um die nativen Antigene zu produzieren.

#### **4.3.2. Herstellung von pseudotypisierten viralen Partikeln**

Um die Problematik der hohen Pathogenität des Lassa Fieber Virus zu umgehen, wurde in dieser Arbeit auf eine alternative Methode – Pseudotypisierung von Viruspartikeln - zurückgegriffen. Da bei einer solchen Produktion lediglich die DNA eines Transfervektors mit einem Markergen, welches das notwendige Verpackungssignal ( $\Psi$ ) enthält, in ein Partikel verpackt wird, sind neue Viren replikationsunfähig und durchlaufen den lentiviralen Replikationszyklus nur bis zur Integration. Dieses Verfahren ermöglicht die detaillierte Untersuchung der verschiedenen Glykoproteine und der spezifischen viralen Infektionsprozesse (Pages and Bru 2004), da die replikationsunfähigen Viruspartikel entsprechende Hüllproteine auf ihrer Oberfläche tragen.

Sieben verschiedene pseudotypisierte Viruspartikel wurden über gammaretro- bzw. lentivirale Verpackungssysteme im Rahmen dieser Arbeit erzeugt. Das gammaretrovirale System leitet sich vom ML Virus ab, das lentivirale System basiert auf HIV. Die Herstellung aller Partikel erfolgte in Mammalia Zellen der Linie 293T. Dabei sollte durch die Verwendung der beiden Vektortypen für die Virusherstellung ein optimaler Weg für die Generierung einer ausreichenden Menge an Zielproteinen für die positive bzw. negative Selektion gefunden werden, wobei ein besonderes

Augenmerk auf deren Bindungseigenschaften gelegt wurde. Zu beachten war, dass die lentiviralen Vektoren eine, verglichen mit gammaretroviralen Konstrukten, komplexere Biologie aufweisen, wodurch sich das Verpacken der Viren über dieses System als deutlich aufwendiger erwies.

Die pseudotypisierten Lassa Viren wurden im weiteren Verlauf der Arbeit als Target für positive Selektion eingesetzt. Die weiteren sechs Pseudotypen dienten als Target für die Präselektion und wurden in ihren Eigenschaften - Titer, Bindungskapazität, Produktionsaufwand – miteinander verglichen, wodurch ein optimales Zielprotein ermittelt wurde.

Die Titerbestimmung der erzeugten Pseudotypen wurde in Abhängigkeit vom Tropismus ihrer viralen Glykoproteine auf den entsprechenden Zelllinien durchgeführt. Unterschiedliche Titer der produzierten Partikel lassen sich durch die variable Anzahl von Hüllproteinen auf der Oberfläche sowie durch Unterschiede in den Replikationszyklen erklären.

Die Expression von heterologen viralen Genen in Säugerzellen (in 293T Zellen) und somit die Anzahl der exprimierten Glykoproteine hängt in entscheidendem Maß von jeweiligen Vektoren ab und kann durch verschiedene Maßnahmen wie Codonoptimierung oder Spleißen gesteigert werden. Bei der Codonoptimierung handelt es sich um eine Modifikation der art-fremden Gensequenzen, welche danach von einer humanen Zelle als autologe Gene wahrgenommen werden. So gelang es durch die Codonoptimierung der *gag-pol* sowie *env* Gene von HIV ein Rev-responsive-Element (RRE) zu eliminieren, welches wahrscheinlich einen negativen Einfluß auf die Stabilität der RNA-Transkripte ausübt (Kotsopoulou, Kim et al. 2000; Wagner, Graf et al. 2010; Graf, Bojak et al. 2000). Auch die Verwendung starker Promotoren wie der des Humanen-Cytomegalie-Virus (HCMV) führt zur Erhöhung der Expression. Allerdings werden die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte zur pseudotypisierten Virusherstellung zum einen durch unterschiedliche Vektoren getragen und zum anderen unterlagen sie während der Herstellung verschiedenen Modifikationen (Codonoptimierung, Spleißen, Steigerung des GC-Gehalts). Daraus resultieren die unterschiedlichen Expressionslevel der jeweiligen Glykoproteine.

Einen anderen wichtigen Aspekt bei der Virusherstellung stellen die für die Virusproduktion verwendeten HEPES-Puffer bzw. deren exakter pH-Wert von 7,05 dar. Der Einsatz unterschiedlicher Pufferchargen, welche zwar nur eine sehr geringere pH-Wert Abweichung aufwiesen, führte jedoch zu einer deutlichen Schwankung der Virustiter innerhalb einer Virusart von bis zu einer log-Stufe.

Da das Matrixprotein Z kein Bestandteil der RNP-Komplexe ist und aufgrund der in der Arbeitsgruppe erzielten Ergebnisse mit Influenza Viren (Dr. T. Haarmann), wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Z Protein kodierendes Konstrukt bei der LASV-Produktion eingesetzt, um ggf. den viralen Titer zu erhöhen. Allerdings führte die Zugabe des Z Plasmids zu dem Transfektionsansatz zu einer Verminderung des Virustiters, wobei dieser inhibitorische Effekt auf die Virusproduktion in Zellen eine stricte Dosisabhängigkeit aufwies. Es bleibt jedoch unklar,

wodurch dieser Effekt hervorgerufen wird. Es konnte anschaulich demonstriert werden, dass die Expression von Z Proteinen in der Zellkultur durch die Interaktion mit L Polymerase sogar die Replikation der Lassa- bzw. LCM Viren verhindern kann. Angesichts dessen ist eine Wechselwirkung zwischen den auf den Gag Pol Plasmiden (HIV und MLV) kodierten essentiellen Strukturproteinen und Enzymen und dem Z Protein nicht auszuschließen (Cornu, Feldmann et al. 2004; Jacamo, Lopez et al. 2003). Zudem führt die Synthese von Z Proteinen in eukaryotischen Zellen zur Knospung und Freisetzung von umhüllten, nichtinfektiösen Partikeln, welche als *virus like particles* bezeichnet werden (Strecker, Eichler et al. 2003), wodurch die Produktion vollständiger viraler Partikel unterbunden wird.

#### **4.3.3. Immobilisierung von pseudotypisierten viralen Partikeln**

Durch die Inkubation der scFv-Phagenbank mit einem Zielprotein werden die spezifischen Antikörperfragmente selektiert und angereichert. Eine Bedingung für eine erfolgreiche Selektion ist die optimale Präsentation des Targets (Hoogenboom 2005). Dies kann durch das Binden an einen Träger wie ELISA-Platten, BIAcore Chips, Beads oder über eine direkte Proteinexpression auf zellulären Oberfläche erfolgen. Auch erfolgreiche *in vivo* Selektionen einer Peptidbibliothek wurden bereits durchgeführt (Pasqualini and Ruoslahti 1996a; Pasqualini and Ruoslahti 1996b). Zu Beginn der Arbeit stellten die mit LASV-Josiah Glykoproteinen (Trimer) stabiltransfizierten 293T Zellen eine mögliche Plattform für die Selektion der Immunbibliotheken dar (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigte sich, dass die Expression von GP in den 293T Zellen bereits nach einigen Passagen herunter reguliert wurde, wodurch nicht genügend Targetprofil zur Verfügung stand.

Die nativen sowie pseudotypisierten Viren gelten als optimales Target für die Selektion antiviraler Antikörper, da die viralen Proteine in ihrer nativen Form auf der Virusoberfläche für Antikörper gut zugänglich präsentiert werden. Eine Voraussetzung für den Einsatz der viralen Partikel für das Screening ist jedoch deren Immobilisierung auf einem Träger. Der klassische Weg für eine Virusimmobilisierung ist deren Bindung über einen bereits vorhandenen Antikörper auf einer ELISA-Platte bzw. auf magnetischen Beads. Da die Spezifität einer solchen Bindung sehr hoch ist, beträgt die Menge der für das Screening benötigten Beads ca.  $1 \times 10^4$  -  $5 \times 10^5$  Partikel pro Vertiefung (Kirsch, Hulseweh et al. 2008).

Da bislang keine monoklonalen Antikörper gegen das Lassa Fieber Virus kommerziell verfügbar sind, war eine indirekte Antigenimmobilisierung nicht möglich. In einer Studie konnten Coronaviren auf den ELISA-Platten (Nunc, MaxiSorb) direkt gebunden werden (van den Brink, Ter Meulen et al. 2005). Die Bindungseigenschaften viraler Partikel hängen in entscheidendem Maße von deren Membranzusammensetzung ab. In dieser Studie zeigten sich die verwendeten Nunc Maxi Sorb Platten am geeignetsten, da sie ein Gemisch aus biologischen Molekülen (Lipiden, Proteinen, Glycanen) absorbieren. Zwar konnte auch im Rahmen dieser Arbeit eine

direkte Virusbindung auf ELISA-Platten mit verschiedenen Oberflächeneigenschaften erzielt werden, die dafür benötigte Virusmenge lag jedoch bei  $1 \times 10^7$  Partikeln pro Vertiefung. Zu betonen ist, dass die besten Ergebnisse auch auf Nunc MaxiSorb Platten produziert wurden. Bei einem durchschnittlichen Titer von  $1 \times 10^8$  Viren/mL würde jedoch der Einsatz dieser Virusmenge pro ELISA-Platten-Vertiefung den Rahmen des zeitlichen sowie finanziellen Aufwandes für die Virusherstellung sprengen. Allerdings lässt sich die benötigte hohe Virusmenge nicht nur durch die viralen Bindungseigenschaften erklären, sondern kann auch auf die in der Arbeit angewandte Nachweismethode zurückgeführt werden. Der Titer der bindenden Antikörper in dem für die Detektion eingesetzten Patienten-Serum lag bei ca. 1200 (halbmaximale Bindung) und ist, verglichen mit den Antikörpertitern bei anderen virologischen Erkrankungen, wie HIV (halbmaximale Bindung bis 5000), relativ niedrig. Dementsprechend ist das Lassa-Serum für Nachweiszwecke als weniger sensitiv einzuordnen.

Um die Bindungs- bzw. Nachweismethoden zu optimieren wurde daraufhin ein System entwickelt, welches auf dem Prinzip des  $\mu$ MACSTM VitalVirus HIV Isolation Kits (Firma Miltenyi Biotech) beruhte. Hierbei werden HIV-1 Viren über den CD44-Marker an mit Antikörpern konjugierten Mikrobeats immobilisiert. CD44 ist ein zelluläres Protein, das bei der Knospung der Viruspartikel in die Virushülle eingebettet wird (Terry, Johnston et al. 2009). Dieser Ansatz basiert auf der Tatsache, dass die zellulären Proteine, wie das vesikuläre Transportprotein Tsg 101 oder verschiedene Chaperone, während der Knospung in die virale Membran integriert werden. Infolgedessen können solche Viren mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern detektiert und bei Bedarf gebunden werden. In Anlehnung an das beschriebene Verfahren wurde ein eigenes System mit stabil transduzierten 293T Zellen etabliert, welche zwei Oberflächenmarker CD20 und CD35 parallel exprimierten. Die in diesen Zellen produzierten viralen Partikel sollten in ihrer Membran entsprechend beide Proteine aufweisen, wodurch eine Erhöhung der viralen Bindungskapazität an verschiedene Träger erreicht werden sollte.

Bei den nachfolgenden ELISA-Tests konnten jedoch keine Oberflächenmarker in den Virushüllen detektiert werden. Eine der möglichen Erklärungen für unterschiedliche Inkorporation der zellulären Proteine in die Hüllmembran ist, dass die neu gebildeten Viren die Zelle nur über spezifische Regionen der zytoplasmatischen Membran verlassen. Diese Membranabschnitte, genannt „Lipid rafts“, zeichnen sich durch einen hohen Lipidgehalt aus und schließen zusätzlich einige Membranproteine ein. Für einige bekannte Viren wie Ebola, Masern, HIV-1 und Influenza ist bekannt, dass diese die Zellen ausschließlich über diese Mikrodomänen verlassen, wobei die in solchen „Lipid rafts“ integrierten Proteine später in viralen Hüllen vorzufinden sind. So konnte demonstriert werden, dass die Behandlung der HI Viren mit  $\beta$ -Zyklodextrin, welches den Cholestereolgehalt in „Lipid rafts“ vermindert, die Porenbildung in den viralen Hüllen auslöste, wodurch die Viren ihre Infektiosität verloren (Graham, Chertova et al. 2003). Ähnliche Befunde wurden mit Influenza, Parainfluenza und Epstein-Barr Viren beschrieben [Zur Übersicht (Cantin,

Methot et al. 2005)]. Anhand der vorliegenden Daten zu Influenza (Pickl, Pimentel-Muinos et al. 2001; Rossman and Lamb 2011) ist anzunehmen, dass das Knospen von Lassa Viren entsprechend auch über solche lipidhaltigen Bereiche erfolgt, während die gewählten Marker möglicherweise nicht in die „lipid raft“ integriert werden.

Daher wurde schließlich die Biotinylierung von pseudotypisierten viralen Partikeln etabliert, um diese über Streptavidin zu immobilisieren. Die Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten nicht kovalenten biologischen Bindungen. In diversen Arbeiten kam diese Methode bereits zum Einsatz (Purow and Staveley-O'Carroll 2005). Vor allem in der Gentherapie findet diese Technik eine breite Anwendung. Die Grundidee dieser Methode ist, durch die Biotinylierung viraler Vektoren und die darauf folgende spezifische Verlinkung mittels Avidin mit biotinylierten Antikörpern, welche spezifische Moleküle auf den Tumorzellen erkennen, einen schnellen und gerichteten Vektortransport in die ausgearteten Zellen zu gewährleisten (Lesch, Kaikkonen et al. 2010; Kaikkonen, Lesch et al. 2009). Die in diesen Studien verwendete Biotinmenge bezieht sich auf die Proteinkonzentration im Ansatz. Da jedoch die Proteinkonzentration im Virus-Aliquot aus Zellkulturüberständen nicht präzise zu ermitteln war und die Anzahl der Glykoproteine auf viralen Lassa Partikeln zwischen 50 – 1500 variiert (Neuman, Adair et al. 2005), wurde zunächst die Menge des einzusetzenden Biotins über das Oberflächenverhältnis zwischen einem Virus und einer Zelle bestimmt und in 100-fachen Überschuss für die Biotinylierung von  $1 \times 10^8$  Viren eingesetzt, um eine Sättigung zu erreichen. Durch eine Titrationsreihe des Biotins konnte der über die Berechnung ermittelte Wert als optimal bestätigt werden. Bei dieser Menge waren nahezu alle infektiösen Viruspartikel biotinyliert, wie der Infektiösitätstest bestätigte. Die biotinylierten Lassa Fieber Viren wurden erfolgreich auf mit Streptavidin beschichteten Trägersystemen immobilisiert. Durch Biotinylierung konnte die Menge der viralen Partikel auf  $5 \times 10^5$  pro ELISA-Platten-Vertiefung und auf  $1 \times 10^6$  pro  $5 \times 10^5$  Beads reduziert werden. Dies resultierte in einer enormen Zeit- und Materialersparnis. Durch den gewählten experimentellen Ansatz konnten zudem erstmals Absorptionswerte von 2,5 bis 3 (oberer Messbereich) erreicht werden, was für eine hohe Sensitivität der Nachweismethode spricht.

Auch die als Target für die negative Selektion fungierenden Viren (Influenza, VSV, HCV, LCMV) zeichneten sich durch eine sehr schwache Bindung an die unterschiedlich beschichteten ELISA-Platten aus. Es gelang erst beim Einsetzen von ca.  $1 \times 10^6$  Partikeln pro Vertiefung, ein deutliches Absorptionssignal zu erzeugen. Die ML Viren hingegen banden bereits mit  $1 \times 10^5$  Partikeln ausreichend stark auf einer ELISA-Platte. Dies und die Tatsache, dass die  $\gamma$ -retroviral produzierten heterologen Lassa Fieber Viren und die homologen MLV die gleichen, unter Virushüllen liegenden, Matrix- und Kapsidproteine aufwiesen und sich nur in den viralen Hüllproteinen unterschieden, führte dazu, dass MLV als Target für die negative Selektion eingesetzt wurde. Dadurch konnten die optimalen Rahmenbedingungen für das Biopanning der

Phagen Bibliothek gewährleistet werden. Zudem gelang es durch die Biotinylierung der MLV, die pro Vertiefung benötigte Virusmenge um eine *log*-Stufe zu reduzieren.

#### **4.4. Biopanning der Antikörperbibliotheken und Charakterisierung spezifischer Phagen**

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die für Biopanning verwendeten MLV- und LASV-Partikel lediglich durch den Austausch der Hüllproteine. Diese Tatsache erweist sich als großer Vorteil beim Screening, da durch eine Prä-Selektion der Bibliotheken mit MLV unspezifische Phagen absorbiert werden, welche gegen das Virus-Kapsid bzw. die zellulären Bestandteile in der Virushülle gerichtet sind. Vergleicht man die Phagentiter nach drei repetitiven Selektionsrunden, war festzustellen, dass der Titer nach der zweiten Selektionsrunde niedriger ausgefallen ist. Die unterschiedlichen Titer lassen sich auf folgende Abläufe zurückführen: nach der ersten Panningsprozedur banden viele Klone, darunter auch unspezifische, an LASV-Proteine und wurden anschließend eluiert. In der zweiten Runde banden die spezifischen Phagen aufgrund der sinkenden Konkurrenz gezielter an das positive Target und die wenigen Unspezifischen wurden durch die zweite Prä-Selektion und verstärktes Waschen entfernt. Als Folge fiel der Titer der eluierten Phagen ab. In der dritten Runde kam es durch die Anreicherung der spezifischen Phagen zu einem Anstieg des Titers.

##### **4.4.1. Selektion und Analyse der Phagen aus der Immunbibliothek**

Nach der Analyse der 72 einzelnen Klone aus der Immunbibliothek in einem ELISA-Test sowie der darauf folgenden Auswertung der Daten lagen die Absorptionswerte der vier scFv-Fragmente weit über die Hintergrundsignale. Alle vier Klone enthielten die leichte Lambda Kette. Da im humanen Serum aufgrund seiner höheren Stabilität mehr Antikörper mit Lambda als mit Kappa Ketten vorliegen, werden auch im Phagen Display oft scFv-Fragmente vom leichten Ketten Typ Lambda angereichert. Es existieren jedoch keine weiteren Informationen über die Isotypen der Antikörper gegen Lassa-virale Proteine, wie NP oder Z, so dass keine Vergleichsanalyse möglich ist.

Da die in einem Phagemid in *E.coli* vorliegenden Gene den wirtseigenen Stoffwechsel beeinflussen und dadurch das Wachstum beeinträchtigt wird, kann es zu einer Konkurrenz zwischen den in der Population vorhandenen vollständigen Phagemid-Klonen und den während der Selektion entstehenden Klonen, welche häufig nur Teile oder gar keine Kette aufweisen, kommen (Tur, Huhn et al. 2001; de Bruin et al. 1999 ). Daraus wird ersichtlich, warum nach der dritten Selektionsrunde der Immunbibliothek zwei der vier Klone eine leichte Kette und nur einen Teil der schweren Kette aufweisen. Zudem findet mit jeder Runde des Selektionsprozesses eine

Anreicherung spezifischer Phagen statt, was dazu führt, dass einige Klone eine identische Sequenz aufweisen. Dies gilt auch für die zwei in diesem Panning gewonnenen Klone D1 und D8. Interessant ist, dass es sich bei beiden um verkürzte scFv handelt, welchen eine Region der schweren Kette fehlt. Diese Ergebnisse bestätigen abermals die Annahme, dass die Klone mit verkürzten Gensegmenten replikationskompetenter sind und in der Population dominieren. Trotz der identischen Sequenzen zeigten die beiden Klone jedoch unterschiedliche Bindungseigenschaften im ELISA-Test. Der Absorptionswert des D1 Klon lag bei 1,3, während der des D8 Klon 0,6 betrug. Auch im nachfolgenden Neutralisationsassay zeichneten sich beide Klone durch unterschiedliches Verhalten aus. Die Neutralisationskapazität der beiden scFv-Fragmente gegenüber LASV lag beim gleichen Volumen von je 1 mL für Klon D1 bei 30% und für Klon D8 bei 65%. Allerdings neutralisierte Klon D1 unspezifisch die als negative Kontrolle eingesetzten ML Viren. Die Neutralisationswerte für MLV betrugen 25% bei Klon D1 und nur 5-8% bei Klon D8. Eine der möglichen Ursachen dafür war die Menge sowie der Reinheitsgrad der im Versuch eingesetzten scFv-Überstände. In weiterführenden Arbeiten wären die Umklonierung, die Expression in Mammalia-Zellen und die anschließende Aufreinigung anzudenken, um diese Punkte genauer nachvollziehen zu können.

Ein weiterer Widerspruch stellt sich bei der Analyse des ELISA-Tests mit löslichem GP1 heraus. Die Bindung an das lösliche Protein sollte einen Hinweis darauf geben, ob das scFv-Epitop im Monomer oder im Trimer erkannt wird. Es wurde erwartet, dass beide Klone aufgrund ihrer Sequenzhomologie die gleichen Bindungseigenschaften aufweisen. Jedoch band Klon D1 im Versuch mit hoher Effizienz an das immobilisierte monomere Protein, während Klon D8 keinerlei Reaktion zeigte. Der Grund für die unterschiedlichen Bindungseigenschaften blieb unklar und soll ermittelt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Bindung der positiven Klone nur auf den Lassa Fieber Viren als Target getestet.

Zwei weitere selektierte Klone, bezeichnet mit B9 und G2, wiesen zwei unabhängige Sequenzen auf und enthielten beide Ketten, wobei Klon B9 über keine CDR1 in der schweren Kette verfügt. Bei den CD Regionen der beiden Klone konnte keine Homologie festgestellt werden. Auch die Länge dieser Abschnitte war unterschiedlich. Es kann daher angenommen werden, dass es sich bei beiden Klonen um zwei völlig unterschiedliche Antikörper handelt. Allerdings konnte aufgrund fehlender Antikörper gegen verschiedene LASV Proteine keine Vergleichsanalyse durchgeführt werden.

Interessanterweise wies der Klon B9 eine Homologie in einzelnen Segmenten mit einem in der Arbeitsgruppe produzierten Antikörper (Maria Hertje, Manuskript in Vorbereitung) gegen ein HIV Trimer-Glykoprotein auf. So sind das J-Segment der leichten Kette gemäß beider Datenbanken (IMGT und VBASE 2) sowie auch das J-Segment der schweren Kette (VBASE 2) identisch mit entsprechenden Abschnitten des HIV Antikörpers. Ob diese AS-Sequenzen auch an der Bindung bzw. Neutralisation beteiligt sind, bleibt jedoch unklar. Der Klon B9 zeigte keine



Reaktion mit dem Lassa GP1, was als Hinweis darauf gelten kann, dass dieses scFv-Fragment an ein Trimer-Glykoprotein bindet. Letztlich neutralisierten die sich im Überstand B9 befindenden scFv spezifisch die Lassa Fieber Viren (ca. 60% Neutralisation mit 1 mL aufgereinigtem Überstand) und reagierten nur unwesentlich mit MLV (bis 8% Neutralisation beim gleichen Volumen). Obwohl der Klon G2 sich im ersten Neutralisationsversuch als vielversprechender Kandidat erwies (70%), demonstrierte dieses scFv-Fragment im zweiten Experiment eine hohe unspezifische (bis zu 40% Neutralisation) Reaktion mit ML Viren. Aufgrund der ELISA-Ergebnisse mit löslichen Lassa GP1 lässt sich vermuten, dass dieser Klon an ein Monomer bindet.

#### ***4.4.2. Selektion und Analyse der Phagen aus der naiven Bibliothek HAL4/7***

Die naiven Bibliotheken mit einer hohen Diversität werden eingesetzt, um hoch affine Antikörper zu selektieren. Die Bibliothek HAL4/7 zeichnet sich durch eine große Diversität von  $5 \times 10^{10}$  sowie eine gute Qualität (der Anteil an vollständigen Antikörperfragmenten bis zu 90%; Toleikis, L., 2004, Dissertation) aus. Aus dieser Bibliothek konnten bereits einige Antikörper isoliert werden. So wurde im Rahmen einer Studie ein Antikörper gegen das tumorassoziierte Antigen Mucin-1 selektiert und durch Affinitätsreifung optimiert (Thie, Toleikis et al.). Ein weiteres Beispiel lieferte die Arbeit von Martina Kirsch, der es gelang, erstmals spezifische Antikörperfragmente gegen ein Pferdeencephalitis-Virus durch Selektion der HAL-Bibliothek mit kompletten Viruspartikeln zu isolieren (Kirsch, Hulseweh et al. 2008).

Die einzelnen Screeningsrunden mit HAL4/7 wurden mit den direkt auf die Nunk MaxiSorb ELISA-Platte immobilisierten viralen Partikeln durchgeführt. Die Analyse der einzelnen Klone erfolgte mit löslichem Glykoprotein 1. Es zeigten nur zwei von 9 isolierten Klonen bindende sowie neutralisierende Reaktionen mit intakten pseudotypisierten Viren. Bei diesen Klonen handelt es sich um das identische scFv-Fragment, welches eine Teil-Homologie (60%) mit D1/D8 aufwies. Auch in diesem Fall reagierte einer der beiden Klone (B5) trotz 100%iger Homologie mit dem C8 Klon unspezifisch mit ML Viren. Der Klon C8 zeigte hingegen nur unwesentliche Hintergrundreaktionen mit dem unspezifischen Target. Da die scFv-haltigen bakteriellen Überstände bei der Messung der Neutralisationseigenschaften nicht aufgereinigt wurden und die Proteinkonzentration nicht normiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Unterschiede in der Neutralisation auf ungleiche Proteinmengen in den Ansätzen zurückgeführt werden können.

Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass die vorausgehenden Resultate auf drei positive scFv Kandidaten B9, D1/D8 und C8/B5 hindeuten, welche in einen Expressionsvektor umklont werden sollen, um weitere tiefer gehende Untersuchungen bezüglich deren Bindungs- und Neutralisationseigenschaften zu ermöglichen.

## 5. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten humane *single chain* Fv-Fragmente B9, D1/D8 und C8/B5 stellen einen geeigneten Ausgangspunkt für die Herstellung vollständig humaner Therapeutika zur Behandlung des LASV dar. Diese Antikörper wiesen sowohl bindende als auch neutralisierende Eigenschaften auf. Um weitere genaue Aussagen über die Bindungs- bzw. Neutralisationskapazität treffen zu können, müssen weitere Schritte zur Aufreinigung sowie Proteinkonzentrationsbestimmung unternommen werden. Hierfür können zuerst die Antikörperkodierenden Gene in geeignete Expressionsvektoren kloniert werden, um einen vollständigen und komplett humanen IgG-Antikörper gleicher Spezifität herzustellen. Es gibt verschiedene eukaryotische Expressionssysteme, welche diesem Zweck dienen können. Das Baculovirus-Expressionssystem ermöglicht ein schnelles und direktes Einfügen der Gene über eine *in-frame Multiple Cloning Site* des Vektors, welcher zu dem den Fc-Teil enthält. Die eingefügten Gene stehen unter Kontrolle eines p10 Promotors. (Liang, Dubel et al. 2001). Die Produktion der vollständigen Antikörper erfolgt in Insekten-Zellen. Ein anderes erfolgreiches Expressionssystem beruht auf den CHO-Zellen, wobei in diesen Zellen produzierte Antikörper vor allem den für Ihre Funktionen notwendigen Modifikationen unterzogen werden (Persic, Roberts et al. 1997).

Des Weiteren sollen die Kreuz-neutralisierenden Eigenschaften der produzierten Antikörper durchleuchtet werden. Hierfür können bereits generierte Vektoren zur Herstellung anderer pseudotypisierter Lassa Viren (AV, NL, CSF-Stämme) genutzt werden, welche dann in Neutralisationsassays eingesetzt werden. Nicht zuletzt sollen die Antikörper-Affinität und Stabilität, welche sie für den Einsatz in der Diagnostik und Therapie von LASV-Infektionen prädestinieren, untersucht und optimiert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agnihothram, S. S., J. York, et al. (2006). "Role of the stable signal peptide and cytoplasmic domain of G2 in regulating intracellular transport of the Junin virus envelope glycoprotein complex." *J Virol* **80**(11): 5189-5198.
- Akamatsu, Y., M. S. Cole, et al. (1993). "Construction of a human Ig combinatorial library from genomic V segments and synthetic CDR3 fragments." *J Immunol* **151**(9): 4651-4659.
- Albritton, L. M., L. Tseng, et al. (1989). "A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection." *Cell* **57**(4): 659-666.
- Aleksandrowicz, P., K. Wolf, et al. (2008). "Viral haemorrhagic fever and vascular alterations." *Hamostaseologie* **28**(1-2): 77-84.
- Baize, S., J. Kaplon, et al. (2004). "Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells." *J Immunol* **172**(5): 2861-2869.
- Baize, S., P. Marianneau, et al. (2009). "Early and strong immune responses are associated with control of viral replication and recovery in lassa virus-infected cynomolgus monkeys." *J Virol* **83**(11): 5890-5903.
- Baldrige, J. R. and M. J. Buchmeier (1992). "Mechanisms of antibody-mediated protection against lymphocytic choriomeningitis virus infection: mother-to-baby transfer of humoral protection." *J Virol* **66**(7): 4252-4257.
- Baldrige, J. R., T. S. McGraw, et al. (1997). "Antibody prevents the establishment of persistent arenavirus infection in synergy with endogenous T cells." *J Virol* **71**(1): 755-758.
- Barbas, C. F., 3rd, A. S. Kang, et al. (1991). "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(18): 7978-7982.
- Barber, G. N., J. C. Clegg, et al. (1987). "Expression of Lassa virus nucleocapsid protein segments in bacteria: purification of high-level expression products and their application in antibody detection." *Gene* **56**(1): 137-144.
- Barresi, R. and K. P. Campbell (2006). "Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease." *J Cell Sci* **119**(Pt 2): 199-207.
- Battegay, M., D. Kyburz, et al. (1993). "Enhancement of disease by neutralizing antiviral antibodies in the absence of primed antiviral cytotoxic T cells." *Eur J Immunol* **23**(12): 3236-3241.
- Battegay, M., D. Moskophidis, et al. (1993). "Impairment and delay of neutralizing antiviral antibody responses by virus-specific cytotoxic T cells." *J Immunol* **151**(10): 5408-5415.
- Beckman, R. A., L. M. Weiner, et al. (2007). "Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors." *Cancer* **109**(2): 170-179.
- Bergthaler, A., L. Flatz, et al. (2009). "Impaired antibody response causes persistence of prototypic T cell-contained virus." *PLoS Biol* **7**(4): e1000080.
- Bergthaler, A., N. U. Gerber, et al. (2006). "Envelope exchange for the generation of live-attenuated arenavirus vaccines." *PLoS Pathog* **2**(6): e51.
- Berkhout, B., K. Arts, et al. "Ribosomal scanning on the 5'-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome." *Nucleic Acids Res* **39**(12): 5232-5244.
- Berman, P. W., W. M. Nunes, et al. (1988). "Expression of membrane-associated and secreted variants of gp160 of human immunodeficiency virus type 1 in vitro and in continuous cell lines." *J Virol* **62**(9): 3135-3142.
- Berman, P. W., L. Riddle, et al. (1989). "Expression and immunogenicity of the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, gp160." *J Virol* **63**(8): 3489-3498.
- Beyer, W. R., D. Popplau, et al. (2003). "Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P." *J Virol* **77**(5): 2866-2872.

- Bird, R. E., K. D. Hardman, et al. (1988). "Single-chain antigen-binding proteins." Science **242**(4877): 423-426.
- Boesen, A., K. Sundar, et al. (2005). "Lassa fever virus peptides predicted by computational analysis induce epitope-specific cytotoxic-T-lymphocyte responses in HLA-A2.1 transgenic mice." Clin Diagn Lab Immunol **12**(10): 1223-1230.
- Bonilla, W. V., D. D. Pinschewer, et al. (2002). "Effects of promyelocytic leukemia protein on virus-host balance." J Virol **76**(8): 3810-3818.
- Borden, K. L. (1998). "RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains." Biochem Cell Biol **76**(2-3): 351-358.
- Borden, K. L., E. J. Campbell Dwyer, et al. (1998). "An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm." J Virol **72**(1): 758-766.
- Borden, K. L., E. J. Campbell Dwyer, et al. (1997). "The promyelocytic leukemia protein PML has a pro-apoptotic activity mediated through its RING domain." FEBS Lett **418**(1-2): 30-34.
- Borio, L., T. Inglesby, et al. (2002). "Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management." Jama **287**(18): 2391-2405.
- Borrow, P. and M. B. Oldstone (1994). "Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells." Virology **198**(1): 1-9.
- Bosch, B. J., R. Bodewes, et al. "Recombinant soluble, multimeric HA and NA exhibit distinctive types of protection against pandemic swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus infection in ferrets." J Virol **84**(19): 10366-10374.
- Botten, J., J. L. Whitton, et al. "A multivalent vaccination strategy for the prevention of Old World arenavirus infection in humans." J Virol **84**(19): 9947-9956.
- Bowden, T. A., M. Crispin, et al. (2009). "Unusual molecular architecture of the machupo virus attachment glycoprotein." J Virol **83**(16): 8259-8265.
- Bowen, M. D., P. E. Rollin, et al. (2000). "Genetic diversity among Lassa virus strains." J Virol **74**(15): 6992-7004.
- Branco, L. M. and R. F. Garry (2009). "Characterization of the Lassa virus GP1 ectodomain shedding: implications for improved diagnostic platforms." Viol J **6**: 147.
- Branco, L. M., J. N. Grove, et al. "Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever." Viol J **7**: 279.
- Branco, L. M., A. Matschiner, et al. (2008). "Bacterial-based systems for expression and purification of recombinant Lassa virus proteins of immunological relevance." Viol J **5**: 74.
- Breitling, F., S. Dubel, et al. (1991). "A surface expression vector for antibody screening." Gene **104**(2): 147-153.
- Brunotte, L., M. Lelke, et al. "Domain structure of Lassa virus L protein." J Virol **85**(1): 324-333.
- Bruns, M., W. Zeller, et al. (1986). "Lymphocytic choriomeningitis virus. IX. Properties of the nucleocapsid." Virology **151**(1): 77-85.
- Buchmeier, M. J., J. H. Elder, et al. (1978). "Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: identification of the virus structural and cell associated polypeptides." Virology **89**(1): 133-145.
- Buchmeier, M. J. and M. B. Oldstone (1979). "Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: evidence for a cell-associated precursor of the virion glycopeptides." Virology **99**(1): 111-120.
- Buckley, S. M. and J. Casals (1970). "Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus." Am J Trop Med Hyg **19**(4): 680-691.
- Burns, J. W. and M. J. Buchmeier (1991). "Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus." Virology **183**(2): 620-629.
- Callis, R. T., P. B. Jahrling, et al. (1982). "Pathology of Lassa virus infection in the rhesus monkey." Am J Trop Med Hyg **31**(5): 1038-1045.

- Campbell, M., D. Buckeridge, et al. (2000). "A systematic review of the effectiveness of environmental awareness interventions." Can J Public Health **91**(2): 137-143.
- Cantin, R., G. Martin, et al. (2001). "A novel virus capture assay reveals a differential acquisition of host HLA-DR by clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 expanded in primary human cells depending on the nature of producing cells and the donor source." J Gen Virol **82**(Pt 12): 2979-2987.
- Cantin, R., S. Methot, et al. (2005). "Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses." J Virol **79**(11): 6577-6587.
- Cao, W., M. D. Henry, et al. (1998). "Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus." Science **282**(5396): 2079-2081.
- Capul, A. A., J. C. de la Torre, et al. "Conserved residues in Lassa fever virus Z protein modulate viral infectivity at the level of the ribonucleoprotein." J Virol **85**(7): 3172-3178.
- Capul, A. A., M. Perez, et al. (2007). "Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains." J Virol **81**(17): 9451-9460.
- Carrion, R., Jr., J. L. Patterson, et al. (2007). "A ML29 reassortant virus protects guinea pigs against a distantly related Nigerian strain of Lassa virus and can provide sterilizing immunity." Vaccine **25**(20): 4093-4102.
- Charrel, R. N., A. C. Brault, et al. (2003). "Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe." Virology **315**(2): 381-388.
- Charrel, R. N., B. Coutard, et al. "Arenaviruses and hantaviruses: from epidemiology and genomics to antivirals." Antiviral Res **90**(2): 102-114.
- Charrel, R. N., J. J. Lemasson, et al. (2003). "New insights into the evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segment sequences." Virology **317**(2): 191-196.
- Clackson, T., H. R. Hoogenboom, et al. (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries." Nature **352**(6336): 624-628.
- Clegg, J. C., G. N. Barber, et al. (1986). "Expression of Lassa virus nucleocapsid gene fragments in bacteria." Med Microbiol Immunol **175**(2-3): 93-95.
- Collis, A. V., A. P. Brouwer, et al. (2003). "Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen." J Mol Biol **325**(2): 337-354.
- Cornu, T. I., H. Feldmann, et al. (2004). "Cells expressing the RING finger Z protein are resistant to arenavirus infection." J Virol **78**(6): 2979-2983.
- Cosset, F. L., P. Marianneau, et al. (2009). "Characterization of Lassa virus cell entry and neutralization with Lassa virus pseudoparticles." J Virol **83**(7): 3228-3237.
- Crotty, S. and R. Andino (2002). "Implications of high RNA virus mutation rates: lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin." Microbes Infect **4**(13): 1301-1307.
- de Carvalho Nicacio, C., R. A. Williamson, et al. (2002). "Neutralizing human Fab fragments against measles virus recovered by phage display." J Virol **76**(1): 251-258.
- de Haard, H. J., N. van Neer, et al. (1999). "A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies." J Biol Chem **274**(26): 18218-18230.
- Di Simone, C. and M. J. Buchmeier (1995). "Kinetics and pH dependence of acid-induced structural changes in the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein complex." Virology **209**(1): 3-9.
- Di Simone, C., M. A. Zandonatti, et al. (1994). "Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike." Virology **198**(2): 455-465.
- Dvoretskaia, V. I., G. V. Bogatkov, et al. (1991). "[The therapeutic efficacy of ribamidil and virazole in experimental Lassa fever in monkeys]." Vopr Virusol **36**(1): 55-57.
- Dvoretskaia, V. I., A. A. Evseev, et al. (1990). "[Comparative evaluation of the antiviral efficacy of virazole and ribamidil in experimental Lassa fever in monkeys]." Vopr Virusol **35**(2): 151-152.

- Earl, P. L., C. C. Broder, et al. (1994). "Native oligomeric human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein elicits diverse monoclonal antibody reactivities." J Virol **68**(5): 3015-3026.
- Earl, P. L., S. Koenig, et al. (1991). "Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses." J Virol **65**(1): 31-41.
- Eichler, R., O. Lenz, et al. (2006). "The role of single N-glycans in proteolytic processing and cell surface transport of the Lassa virus glycoprotein GP-C." Virol J **3**: 41.
- Eichler, R., O. Lenz, et al. (2003). "Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor." EMBO Rep **4**(11): 1084-1088.
- Eichler, R., T. Strecker, et al. (2004). "Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP)." Virus Res **100**(2): 249-255.
- Emmerich, P., C. Thome-Bolduan, et al. (2006). "Reverse ELISA for IgG and IgM antibodies to detect Lassa virus infections in Africa." J Clin Virol **37**(4): 277-281.
- Emonet, S., J. J. Lemasson, et al. (2006). "Phylogeny and evolution of old world arenaviruses." Virology **350**(2): 251-257.
- Emonet, S. E., S. Urata, et al. "Arenavirus reverse genetics: new approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies." Virology **411**(2): 416-425.
- Eschli, B., K. Quirin, et al. (2006). "Identification of an N-terminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins." J Virol **80**(12): 5897-5907.
- Fischer, S. A., M. B. Graham, et al. (2006). "Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation." N Engl J Med **354**(21): 2235-2249.
- Fisher-Hoch, S. P., L. Hutwagner, et al. (2000). "Effective vaccine for lassa fever." J Virol **74**(15): 6777-6783.
- Fisher-Hoch, S. P. and J. B. McCormick (2001). "Towards a human Lassa fever vaccine." Rev Med Virol **11**(5): 331-341.
- Fisher-Hoch, S. P. and J. B. McCormick (2004). "Lassa fever vaccine." Expert Rev Vaccines **3**(2): 189-197.
- Fisher-Hoch, S. P., J. B. McCormick, et al. (1989). "Protection of rhesus monkeys from fatal Lassa fever by vaccination with a recombinant vaccinia virus containing the Lassa virus glycoprotein gene." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(1): 317-321.
- Fisher-Hoch, S. P., S. W. Mitchell, et al. (1987). "Physiological and immunologic disturbances associated with shock in a primate model of Lassa fever." J Infect Dis **155**(3): 465-474.
- Flatz, L., A. N. Hegazy, et al. "Development of replication-defective lymphocytic choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8+ T cell immunity." Nat Med **16**(3): 339-345.
- Freed, E. O. (2003). "The HIV-TSG101 interface: recent advances in a budding field." Trends Microbiol **11**(2): 56-59.
- Froeschke, M., M. Basler, et al. (2003). "Long-lived signal peptide of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein pGP-C." J Biol Chem **278**(43): 41914-41920.
- Fuller-Pace, F. V. and P. J. Southern (1989). "Detection of virus-specific RNA-dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: in vitro synthesis of full-length viral RNA species." J Virol **63**(5): 1938-1944.
- Gallagher, W. R., C. DiSimone, et al. (2001). "The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor." BMC Microbiol **1**: 1.
- Garbutt, M., R. Liebscher, et al. (2004). "Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses." J Virol **78**(10): 5458-5465.

- Geisbert, T. W., S. Jones, et al. (2005). "Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever." PLoS Med **2**(6): e183.
- Glushakova, S. E., I. S. Lukashevich, et al. (1990). "[The detection of a presumed fusion peptide comprising the surface glycoproteins of arenaviruses]." Vopr Virusol **35**(5): 405-408.
- Glushakova, S. E., V. G. Omel'ianenko, et al. (1991). "[Fusion of artificial lipid membranes induced by synthetic "fusion peptide" of arenaviruses]." Biokhimiia **56**(4): 579-588.
- Goldsmith, M. E. and W. H. Konigsberg (1977). "Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties, and location in the virus." Biochemistry **16**(12): 2686-2694.
- Gowen, B. B., M. H. Wong, et al. (2007). "In vitro and in vivo activities of T-705 against arenavirus and bunyavirus infections." Antimicrob Agents Chemother **51**(9): 3168-3176.
- Graf, M., A. Bojak, et al. (2000). "Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression." J Virol **74**(22): 10822-10826.
- Graham, D. R., E. Chertova, et al. (2003). "Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts." J Virol **77**(15): 8237-8248.
- Gray, C. W., R. S. Brown, et al. (1981). "Adsorption complex of filamentous fd virus." J Mol Biol **146**(4): 621-627.
- Griffiths, A. D., M. Malmqvist, et al. (1993). "Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries." Embo J **12**(2): 725-734.
- Gunther, S., P. Emmerich, et al. (2000). "Imported lassa fever in Germany: molecular characterization of a new lassa virus strain." Emerg Infect Dis **6**(5): 466-476.
- Gunther, S., O. Kuhle, et al. (2001). "Antibodies to Lassa virus Z protein and nucleoprotein co-occur in human sera from Lassa fever endemic regions." Med Microbiol Immunol **189**(4): 225-229.
- Gunther, S. and O. Lenz (2004). "Lassa virus." Crit Rev Clin Lab Sci **41**(4): 339-390.
- Halic, M., T. Becker, et al. (2004). "Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome." Nature **427**(6977): 808-814.
- Hangartner, L., R. M. Zellweger, et al. (2006). "Nonneutralizing antibodies binding to the surface glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus reduce early virus spread." J Exp Med **203**(8): 2033-2042.
- Hara, Y., B. Balci-Hayta, et al. "A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy." N Engl J Med **364**(10): 939-946.
- Hass, M., U. Golnitz, et al. (2004). "Replicon system for Lassa virus." J Virol **78**(24): 13793-13803.
- Hawkins, R. E., S. J. Russell, et al. (1993). "The contribution of contact and non-contact residues of antibody in the affinity of binding to antigen. The interaction of mutant D1.3 antibodies with lysozyme." J Mol Biol **234**(4): 958-964.
- Hensley, L. E., M. A. Smith, et al. "Pathogenesis of Lassa Fever in Cynomolgus Macaques." Virol J **8**(1): 205.
- Hoet, R. M., E. H. Cohen, et al. (2005). "Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity." Nat Biotechnol **23**(3): 344-348.
- Hoogenboom, H. R. (1997). "Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies." Trends Biotechnol **15**(2): 62-70.
- Hoogenboom, H. R. (2005). "Selecting and screening recombinant antibody libraries." Nat Biotechnol **23**(9): 1105-1116.
- Hudson, P. J. and A. A. Kortt (1999). "High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies." J Immunol Methods **231**(1-2): 177-189.
- Hust, M. and S. Dubel (2004). "Mating antibody phage display with proteomics." Trends Biotechnol **22**(1): 8-14.

- Hust, M. and S. Dubel (2005). "Phage display vectors for the in vitro generation of human antibody fragments." Methods Mol Biol **295**: 71-96.
- Illick, M. M., L. M. Branco, et al. (2008). "Uncoupling GP1 and GP2 expression in the Lassa virus glycoprotein complex: implications for GP1 ectodomain shedding." Virology **5**: 161.
- Jacamo, R., N. Lopez, et al. (2003). "Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis." J Virol **77**(19): 10383-10393.
- Jahrling, P. B. and C. J. Peters (1984). "Passive antibody therapy of Lassa fever in cynomolgus monkeys: importance of neutralizing antibody and Lassa virus strain." Infect Immun **44**(2): 528-533.
- Johnson, K. M., J. B. McCormick, et al. (1987). "Clinical virology of Lassa fever in hospitalized patients." J Infect Dis **155**(3): 456-464.
- Kaikkonen, M. U., H. P. Lesch, et al. (2009). "(Strept)avidin-displaying lentiviruses as versatile tools for targeting and dual imaging of gene delivery." Gene Ther **16**(7): 894-904.
- Keenan, R. J., D. M. Freymann, et al. (2001). "The signal recognition particle." Annu Rev Biochem **70**: 755-775.
- Khurana, S., C. Larkin, et al. "Recombinant HA1 produced in E. coli forms functional oligomers and generates strain-specific SRID potency antibodies for pandemic influenza vaccines." Vaccine **29**(34): 5657-5665.
- Kiley, M. P., J. V. Lange, et al. (1979). "Protection of rhesus monkeys from Lassa virus by immunisation with closely related Arenavirus." Lancet **2**(8145): 738.
- Kirsch, M. I., B. Hulseweh, et al. (2008). "Development of human antibody fragments using antibody phage display for the detection and diagnosis of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV)." BMC Biotechnol **8**: 66.
- Knappik, A., L. Ge, et al. (2000). "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides." J Mol Biol **296**(1): 57-86.
- Kotsopoulou, E., V. N. Kim, et al. (2000). "A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene." J Virol **74**(10): 4839-4852.
- Kramer, R. A., W. E. Marissen, et al. (2005). "The human antibody repertoire specific for rabies virus glycoprotein as selected from immune libraries." Eur J Immunol **35**(7): 2131-2145.
- Kunz, S. (2009). "Receptor binding and cell entry of Old World arenaviruses reveal novel aspects of virus-host interaction." Virology **387**(2): 245-249.
- Kunz, S. (2009). "The role of the vascular endothelium in arenavirus haemorrhagic fevers." Thromb Haemost **102**(6): 1024-1029.
- Kunz, S., P. Borrow, et al. (2002). "Receptor structure, binding, and cell entry of arenaviruses." Curr Top Microbiol Immunol **262**: 111-137.
- Kunz, S., L. Calder, et al. (2004). "Electron microscopy of an alpha-dystroglycan fragment containing receptor sites for lymphocytic choriomeningitis virus and laminin, and use of the receptoid body as a reagent to neutralize virus." Virology **325**(2): 207-215.
- Kunz, S., K. H. Edelmann, et al. (2003). "Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions." Virology **314**(1): 168-178.
- Kunz, S., J. M. Rojek, et al. (2005). "Characterization of the interaction of lassa fever virus with its cellular receptor alpha-dystroglycan." J Virol **79**(10): 5979-5987.
- Kunz, S., N. Sevilla, et al. (2001). "Molecular analysis of the interaction of LCMV with its cellular receptor [alpha]-dystroglycan." J Cell Biol **155**(2): 301-310.
- Lecompte, E., E. Fichet-Calvet, et al. (2006). "Mastomys natalensis and Lassa fever, West Africa." Emerg Infect Dis **12**(12): 1971-1974.
- Lee, A. M., J. M. Rojek, et al. (2008). "Inhibition of cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus by amphipathic DNA polymers." Virology **372**(1): 107-117.
- Lee, A. M., J. M. Rojek, et al. (2008). "Unique small molecule entry inhibitors of hemorrhagic fever arenaviruses." J Biol Chem **283**(27): 18734-18742.



- Lee, K. J., I. S. Novella, et al. (2000). "NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs." J Virol **74**(8): 3470-3477.
- Lelke, M., L. Brunotte, et al. "An N-terminal region of Lassa virus L protein plays a critical role in transcription but not replication of the virus genome." J Virol **84**(4): 1934-1944.
- Lenz, O., J. ter Meulen, et al. (2001). "The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12701-12705.
- Lesch, H. P., M. U. Kaikkonen, et al. "Avidin-biotin technology in targeted therapy." Expert Opin Drug Deliv **7**(5): 551-564.
- Li, Y., J. J. Bergeron, et al. (1996). "Effects of inefficient cleavage of the signal sequence of HIV-1 gp 120 on its association with calnexin, folding, and intracellular transport." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9606-9611.
- Liang, M., S. Dubel, et al. (2001). "Baculovirus expression cassette vectors for rapid production of complete human IgG from phage display selected antibody fragments." J Immunol Methods **247**(1-2): 119-130.
- Lim, H. W., P. Hillsamer, et al. (2005). "Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells." J Immunol **175**(7): 4180-4813.
- Lipovsek, D. and A. Pluckthun (2004). "In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display." J Immunol Methods **290**(1-2): 51-67.
- Little, M., M. Welschof, et al. (1999). "Generation of a large complex antibody library from multiple donors." J Immunol Methods **231**(1-2): 3-9.
- Lukashevich, I. S., R. Carrion, Jr., et al. (2008). "Safety, immunogenicity, and efficacy of the ML29 reassortant vaccine for Lassa fever in small non-human primates." Vaccine **26**(41): 5246-5254.
- Lukashevich, I. S., R. Maryankova, et al. (1999). "Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression." J Med Virol **59**(4): 552-560.
- Lukashevich, I. S., J. Patterson, et al. (2005). "A live attenuated vaccine for Lassa fever made by reassortment of Lassa and Mopeia viruses." J Virol **79**(22): 13934-13942.
- Luthman, H. and G. Magnusson (1983). "High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells." Nucleic Acids Res **11**(5): 1295-1308.
- Macher, A. M. and M. S. Wolfe (2006). "Historical Lassa fever reports and 30-year clinical update." Emerg Infect Dis **12**(5): 835-837.
- Mahanty, S., D. G. Bausch, et al. (2001). "Low levels of interleukin-8 and interferon-inducible protein-10 in serum are associated with fatal infections in acute Lassa fever." J Infect Dis **183**(12): 1713-1721.
- Mahanty, S., K. Hutchinson, et al. (2003). "Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses." J Immunol **170**(6): 2797-2801.
- Majumdar, S., A. Chen, et al. "Novel circular, cyclic and acyclic Psi(CH<sub>2</sub>O) containing peptide inhibitors of SKI-1/S1P: synthesis, kinetic and biochemical evaluations." Curr Med Chem **18**(18): 2770-2782.
- McCormick, J. B. and S. P. Fisher-Hoch (2002). "Lassa fever." Curr Top Microbiol Immunol **262**: 75-109.
- McCormick, J. B., I. J. King, et al. (1986). "Lassa fever. Effective therapy with ribavirin." N Engl J Med **314**(1): 20-26.
- McCormick, J. B., S. W. Mitchell, et al. (1992). "Inactivated Lassa virus elicits a non protective immune response in rhesus monkeys." J Med Virol **37**(1): 1-7.
- McCormick, J. B., D. H. Walker, et al. (1986). "Lassa virus hepatitis: a study of fatal Lassa fever in humans." Am J Trop Med Hyg **35**(2): 401-407.
- McCormick, J. B., P. A. Webb, et al. (1987). "A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever." J Infect Dis **155**(3): 437-444.
- Mendenhall, M., A. Russell, et al. "T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture." Antimicrob Agents Chemother **55**(2): 782-787.

- Meulen, J., M. Badusche, et al. (2004). "Old and New World arenaviruses share a highly conserved epitope in the fusion domain of the glycoprotein 2, which is recognized by Lassa virus-specific human CD4+ T-cell clones." *Virology* **321**(1): 134-143.
- Mitchell, S. W. and J. B. McCormick (1984). "Physicochemical inactivation of Lassa, Ebola, and Marburg viruses and effect on clinical laboratory analyses." *J Clin Microbiol* **20**(3): 486-489.
- Monath, T. P. (1973). "Lassa fever: a new appraisal." *Niger Med J* **3**(3): 162-163.
- Moshkoff, D. A., M. S. Salvato, et al. (2007). "Molecular characterization of a reassortant virus derived from Lassa and Mopeia viruses." *Virus Genes* **34**(2): 169-176.
- Moulard, M., S. K. Phogat, et al. (2002). "Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 6913-6918.
- Nayak, D. P., A. R. Davis, et al. (1985). "Biological and immunological properties of haemagglutinin and neuraminidase expressed from cloned cDNAs in prokaryotic and eukaryotic cells." *Vaccine* **3**(3 Suppl): 165-171.
- Neuman, B. W., B. D. Adair, et al. (2005). "Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis." *J Virol* **79**(6): 3822-3830.
- Odermatt, B., M. Eppler, et al. (1991). "Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(18): 8252-8256.
- Oldstone, M. B. and K. P. Campbell "Decoding arenavirus pathogenesis: essential roles for alpha-dystroglycan-virus interactions and the immune response." *Virology* **411**(2): 170-179.
- Olschlager, S., J. Neyts, et al. "Depletion of GTP pool is not the predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral effect on Lassa virus." *Antiviral Res* **91**(2): 89-93.
- Pages, J. C. and T. Bru (2004). "Toolbox for retrovectorologists." *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S67-82.
- Palacios, G., J. Druce, et al. (2008). "A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases." *N Engl J Med* **358**(10): 991-998.
- Parmley, S. F. and G. P. Smith (1988). "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes." *Gene* **73**(2): 305-318.
- Pasqualini, R. and E. Ruoslahti (1996). "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries." *Nature* **380**(6572): 364-366.
- Pasqualini, R. and E. Ruoslahti (1996). "Tissue targeting with phage peptide libraries." *Mol Psychiatry* **1**(6): 423.
- Perez, M., R. C. Craven, et al. (2003). "The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12978-12983.
- Perez, M., D. L. Greenwald, et al. (2004). "Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding." *J Virol* **78**(20): 11443-11448.
- Persic, L., A. Roberts, et al. (1997). "An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries." *Gene* **187**(1): 9-18.
- Pickl, W. F., F. X. Pimentel-Muinos, et al. (2001). "Lipid rafts and pseudotyping." *J Virol* **75**(15): 7175-7183.
- Pinschewer, D. D., L. Flatz, et al. "Innate and adaptive immune control of genetically engineered live-attenuated arenavirus vaccine prototypes." *Int Immunol* **22**(9): 749-756.
- Pinschewer, D. D., M. Perez, et al. (2004). "Kinetics of protective antibodies are determined by the viral surface antigen." *J Clin Invest* **114**(7): 988-993.
- Planz, O., P. Seiler, et al. (1996). "Specific cytotoxic T cells eliminate B cells producing virus-neutralizing antibodies [corrected]." *Nature* **382**(6593): 726-729.
- Purow, B. and K. Staveley-O'Carroll (2005). "Targeting of vaccinia virus using biotin-avidin viral coating and biotinylated antibodies." *J Surg Res* **123**(1): 49-54.

- Qi, X., S. Lan, et al. "Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure." Nature **468**(7325): 779-783.
- Raiborg, C. and H. Stenmark (2009). "The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins." Nature **458**(7237): 445-452.
- Rambukkana, A., S. Kunz, et al. (2003). "Targeting Schwann cells by nonlytic arenaviral infection selectively inhibits myelination." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 16071-16076.
- Recher, M., K. S. Lang, et al. (2004). "Deliberate removal of T cell help improves virus-neutralizing antibody production." Nat Immunol **5**(9): 934-942.
- Rehm, A., P. Stern, et al. (2001). "Signal peptide cleavage of a type I membrane protein, HCMV US11, is dependent on its membrane anchor." Embo J **20**(7): 1573-1582.
- Rodrigo, W. W., J. C. de la Torre, et al. "Use of single-cycle infectious lymphocytic choriomeningitis virus to study hemorrhagic fever arenaviruses." J Virol **85**(4): 1684-1695.
- Rojek, J. M., A. B. Sanchez, et al. (2008). "Different mechanisms of cell entry by human-pathogenic Old World and New World arenaviruses." J Virol **82**(15): 7677-7687.
- Rossman, J. S. and R. A. Lamb "Influenza virus assembly and budding." Virology **411**(2): 229-236.
- Salazar-Bravo, J., L. A. Ruedas, et al. (2002). "Mammalian reservoirs of arenaviruses." Curr Top Microbiol Immunol **262**: 25-63.
- Salvato, M. S., K. J. Schweighofer, et al. (1992). "Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus." Virus Res **22**(3): 185-198.
- Sblattero, D., J. Lou, et al. (2001). "In vivo recombination as a tool to generate molecular diversity in phage antibody libraries." J Biotechnol **74**(4): 303-315.
- Schlie, K., A. Maisa, et al. "Viral protein determinants of Lassa virus entry and release from polarized epithelial cells." J Virol **84**(7): 3178-3188.
- Schlie, K., T. Strecker, et al. "Maturation cleavage within the ectodomain of Lassa virus glycoprotein relies on stabilization by the cytoplasmic tail." FEBS Lett **584**(21): 4379-4382.
- Schmitz, H., B. Kohler, et al. (2002). "Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever." Microbes Infect **4**(1): 43-50.
- Schnittler, H. J. and H. Feldmann (2003). "Viral hemorrhagic fever--a vascular disease?" Thromb Haemost **89**(6): 967-972.
- Sevilla, N., S. Kunz, et al. (2000). "Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells." J Exp Med **192**(9): 1249-1260.
- Sevilla, N., S. Kunz, et al. (2003). "Infection of dendritic cells by lymphocytic choriomeningitis virus." Curr Top Microbiol Immunol **276**: 125-144.
- Shibasaki, S. and M. Ueda "Development of yeast molecular display systems focused on therapeutic proteins, enzymes, and foods: functional analysis of proteins and its application to bioconversion." Recent Pat Biotechnol **4**(3): 198-213.
- Shih, S. R. and R. M. Krug (1996). "Surprising function of the three influenza viral polymerase proteins: selective protection of viral mRNAs against the cap-snatching reaction catalyzed by the same polymerase proteins." Virology **226**(2): 430-435.
- Shih, S. R., M. E. Nemeroff, et al. (1995). "The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(14): 6324-6328.
- Shtanko, O., S. Watanabe, et al. "ALIX/AIP1 is required for NP incorporation into Mopeia virus Z-induced virus-like particles." J Virol **85**(7): 3631-3641.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." Science **228**(4705): 1315-1317.
- Strecker, T., R. Eichler, et al. (2003). "Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]." J Virol **77**(19): 10700-10705.
- Strecker, T., A. Maisa, et al. (2006). "The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z." Virol J **3**: 93.

- ter Meulen, J., M. Badusche, et al. (2000). "Characterization of human CD4(+) T-cell clones recognizing conserved and variable epitopes of the Lassa virus nucleoprotein." J Virol **74**(5): 2186-2192.
- Terry, V. H., I. C. Johnston, et al. (2009). "CD44 microbeads accelerate HIV-1 infection in T cells." Virology **388**(2): 294-304.
- Thie, H., L. Toleikis, et al. "Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody." PLoS One **6**(1): e15921.
- Todorovska, A., R. C. Roovers, et al. (2001). "Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting." J Immunol Methods **248**(1-2): 47-66.
- Tur, M. K., M. Huhn, et al. (2001). "Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages." Biotechniques **30**(2): 404-408, 410, 412-403.
- Ueda, M. and S. Shibasaki "Molecular display technologies--development and improvement of powerful solutions in medical, pharmaceutical, and sustainable biotechnology." Recent Pat Biotechnol **4**(3): 170.
- Urata, S., N. Yun, et al. "Antiviral activity of a small-molecule inhibitor of arenavirus glycoprotein processing by the cellular site 1 protease." J Virol **85**(2): 795-803.
- van den Brink, E. N., J. Ter Meulen, et al. (2005). "Molecular and biological characterization of human monoclonal antibodies binding to the spike and nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus." J Virol **79**(3): 1635-1644.
- Vieth, S., A. E. Torda, et al. (2004). "Sequence analysis of L RNA of Lassa virus." Virology **318**(1): 153-168.
- Vo, N. V., K. C. Young, et al. (2003). "Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase." Biochemistry **42**(35): 10462-10471.
- Waffarn, E. E. and N. Baumgarth (2011). "Protective B cell responses to flu--no fluke!" J Immunol **186**(7): 3823-3829.
- Wagner, R., M. Graf, et al. (2000). "Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors." Hum Gene Ther **11**(17): 2403-2413.
- Wang, H., R. Paul, et al. (1991). "Plasma membrane receptors for ecotropic murine retroviruses require a limiting accessory factor." J Virol **65**(12): 6468-6477.
- Wang, M. and M. He (2007). "The rapid discovery of engineered antibodies." IDrugs **10**(8): 562-565.
- Weidmann, M., A. A. Sall, et al. "Quantitative analysis of particles, genomes and infectious particles in supernatants of haemorrhagic fever virus cell cultures." Virology **8**: 81.
- Welschof, M., P. Terness, et al. (1997). "The antigen-binding domain of a human IgG-anti-F(ab')<sub>2</sub> autoantibody." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1902-1907.
- Whitby, L. R., A. M. Lee, et al. (2009). "Characterization of lassa virus cell entry inhibitors: determination of the active enantiomer by asymmetric synthesis." Bioorg Med Chem Lett **19**(14): 3771-3774.
- Winder, S. J. (2001). "The complexities of dystroglycan." Trends Biochem Sci **26**(2): 118-124.
- Wolin, S. L. and P. Walter (1993). "Discrete nascent chain lengths are required for the insertion of presecretory proteins into microsomal membranes." J Cell Biol **121**(6): 1211-1219.
- Wright, K. E. and M. J. Buchmeier (1991). "Antiviral antibodies attenuate T-cell-mediated immunopathology following acute lymphocytic choriomeningitis virus infection." J Virol **65**(6): 3001-3006.
- York, J., S. S. Agnihothram, et al. (2005). "Genetic analysis of heptad-repeat regions in the G2 fusion subunit of the Junin arenavirus envelope glycoprotein." Virology **343**(2): 267-274.
- York, J. and J. H. Nunberg (2006). "Role of the stable signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion." J Virol **80**(15): 7775-7780.
- Zavada, J. (1982). "The pseudotypic paradox." J Gen Virol **63** (Pt 1): 15-24.

## Poster, Dissertationen und Bücher:

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S.: 2007, Cellular and Molecular Immunology, 6. Auflage, Saunders.
2. Breitling, F. & Dübel, S.: 1997, Rekombinante Antikörper, Spektrum Akademischer Verlag.
3. Dübel, S. & Kontermann, R. E.: 2001, Recombinant Antibodies, in Kontermann, R. E. & 4.
4. Dübel, S. (Eds.), Antibody Engineering, Springer-Verlag, pp. 3–16.
5. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M.: 2002, Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag
6. Liddell, E. & Weeks, I.: 1996, Antikörper-Techniken, Spektrum Akademischer Verlag.
7. Lennartz F., Schlie K., Dörrbecker J., Garten W. (2007). „Purification of Lassa Fieber Virusglycoprotein expressed in insect cells“. Posterbeitrag.
8. Radoshitzky S., Longobardi L., Kuhn J., Retterer C., Dong L., Clester J., Kota K., Bavary S. (2010). „Machupo virus glycoprotein determinants for human transferrin receptor binding and cell entry“. Posterbeitrag.
9. Toleikis, L. (2004). „Rekombinante Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1“. Dissertation,
10. Schmiedl, A. & Dübel, S. (2004): *Rekombinante Antikörper & Phagen-Display* In: M. Wink. (Hrsg.): *Molekulare Biotechnologie*. Wiley-VCH. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
11. Webster, R.: 2001, Filamentous Phage Biology, in Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J. (Eds.), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1.1–1.37.

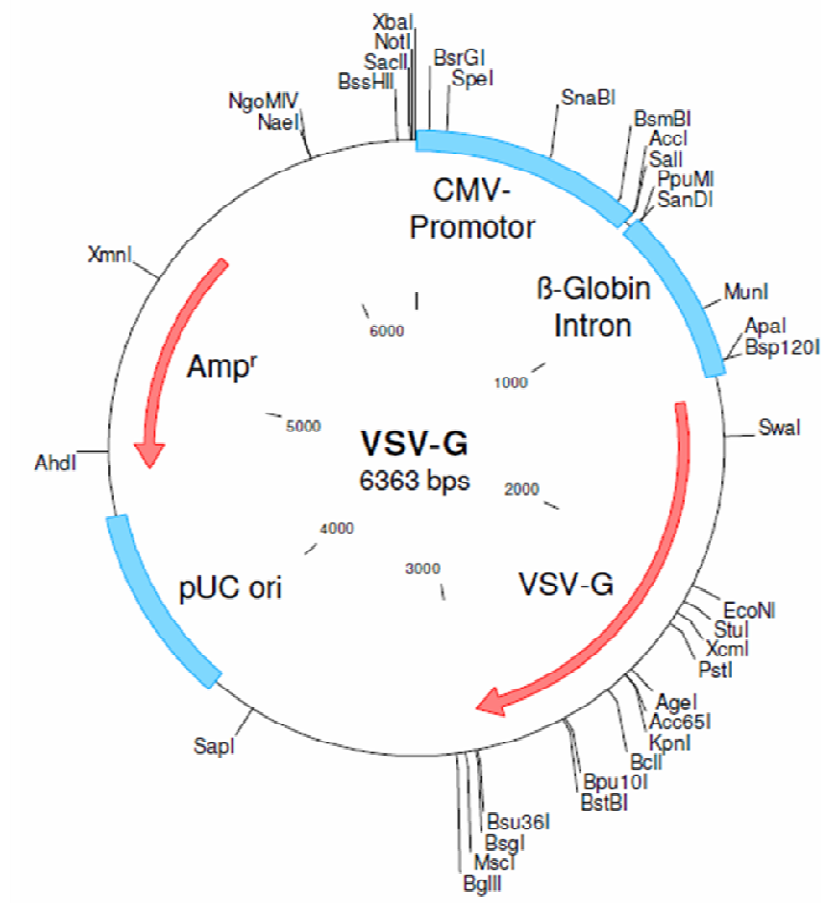
## 7. Anhang

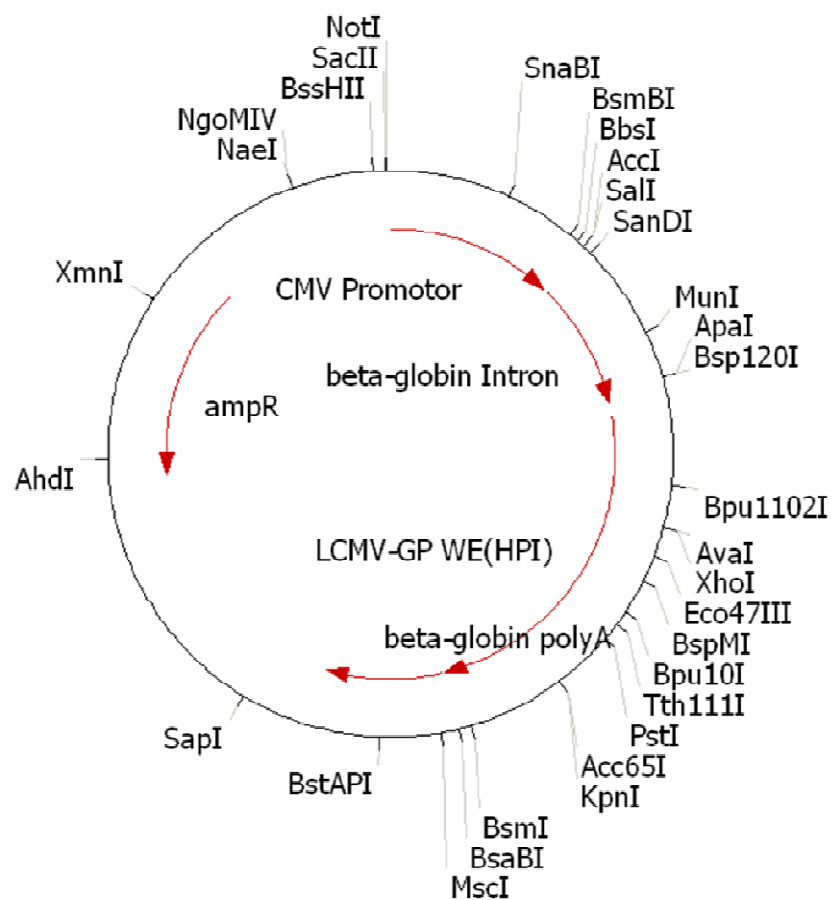
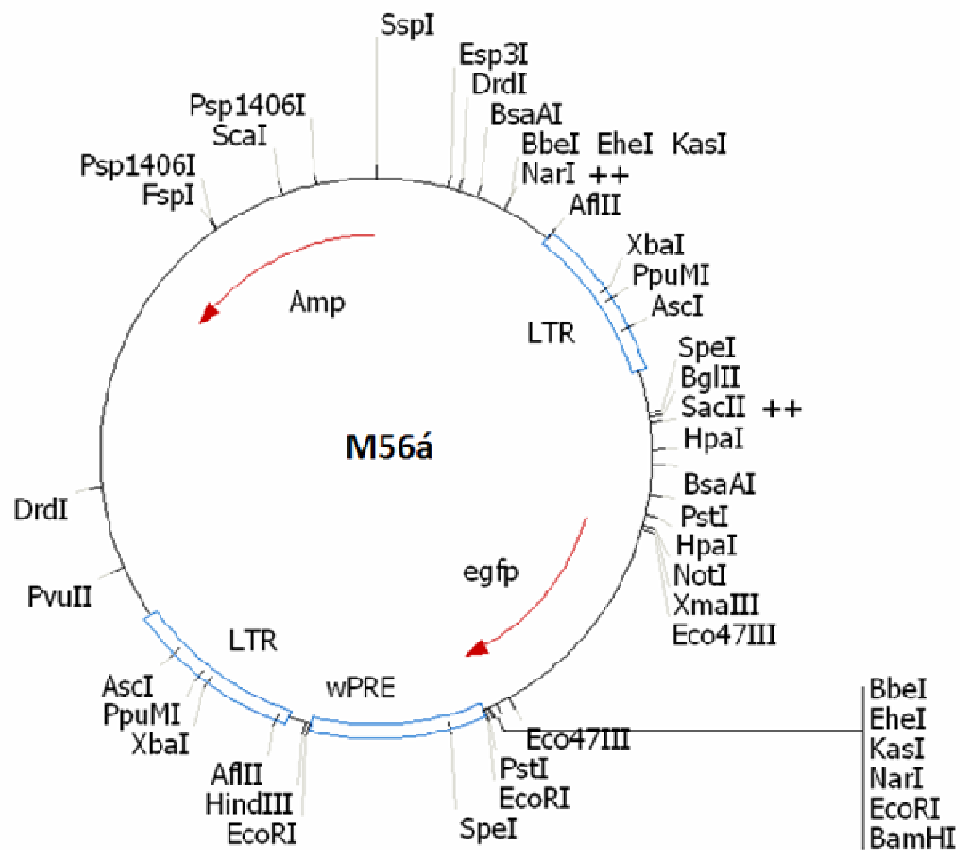
### 7.1. Vektorkarten

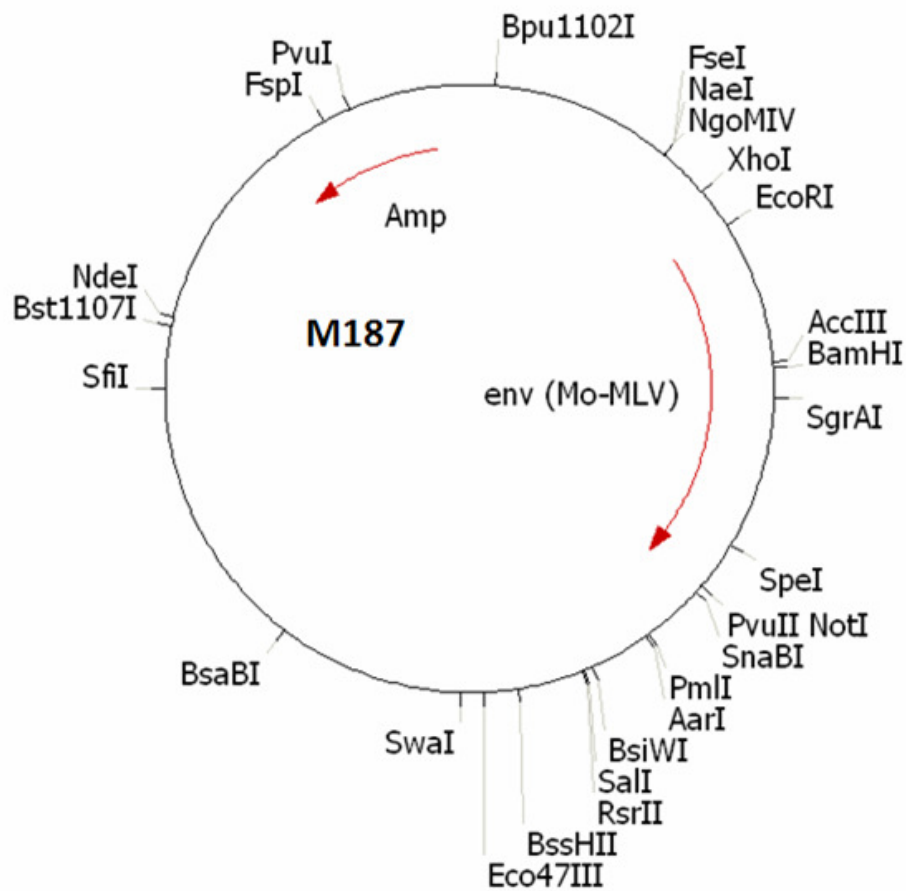
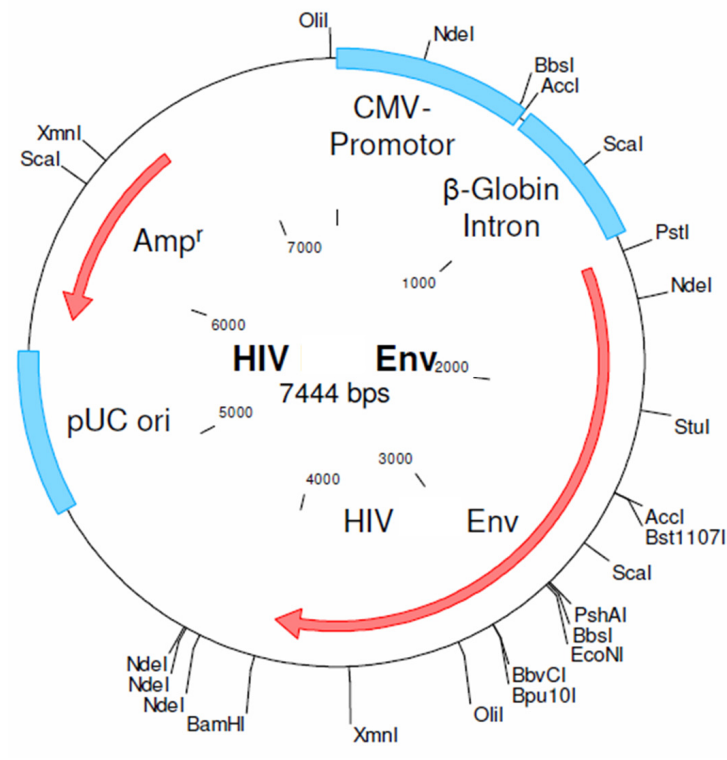
In diesem Abschnitt sind die Karten der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt. Die Karten wurden freundlicherweise von Dr. D. von Laer bzw. Dr. M. Grez zur Verfügung gestellt sowie den Internetseiten der Vertreiberfirmen entnommen.

Für die Karten von der Gruppe von Laer gilt: rote Pfeile markieren Gene, blaue Bereiche stellen wichtige Sequenzelemente dar. Abkürzungen: Amp<sup>r</sup>: Ampicillinresistenzgen; CMV: Cytomegalovirus; cPPT: central polypurine tract; eGFP: enhanced green fluorescent protein; gagpol: Gruppenspezifische Antigene und Polymerase; IRES: internal ribosome entry site; LacZ:  $\beta$ -Galactosidasegen; LTR: long terminal repeat; MCS: multiple cloning site; ORF: offener Leserahmen; ori: Replikationsursprung, pol: Polymerase, rev: regulator of expression of virion proteins, pUC: pUC Plasmid; RRE: Rev responsive element; SFFV: Spleen focus-forming virus; SV40: Simian Virus 40, wPRE: Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; Zeor: Zeocinresistenzgen

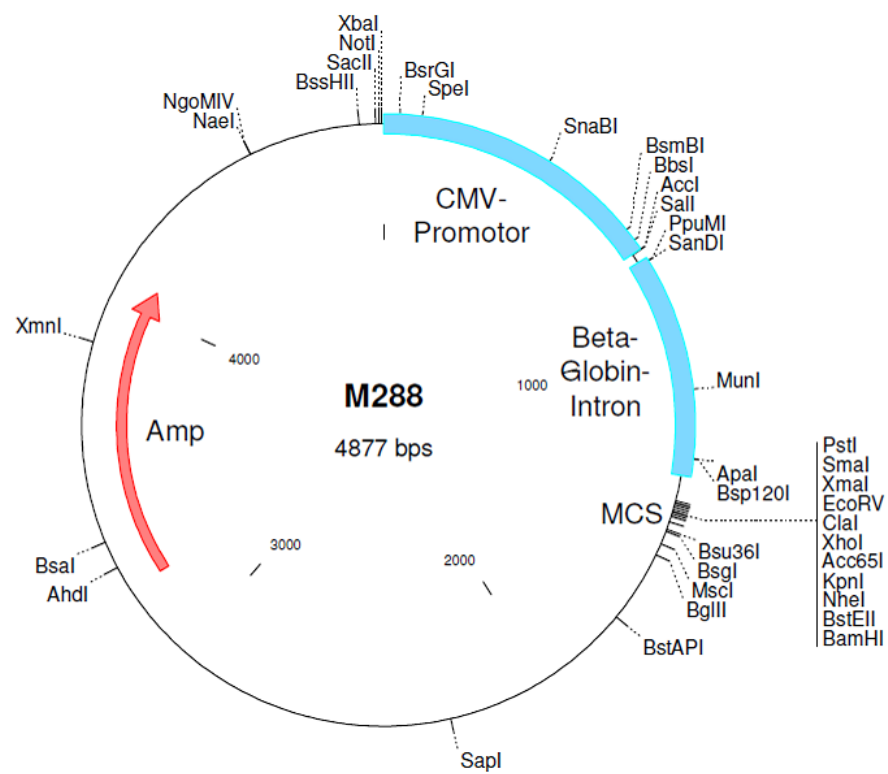
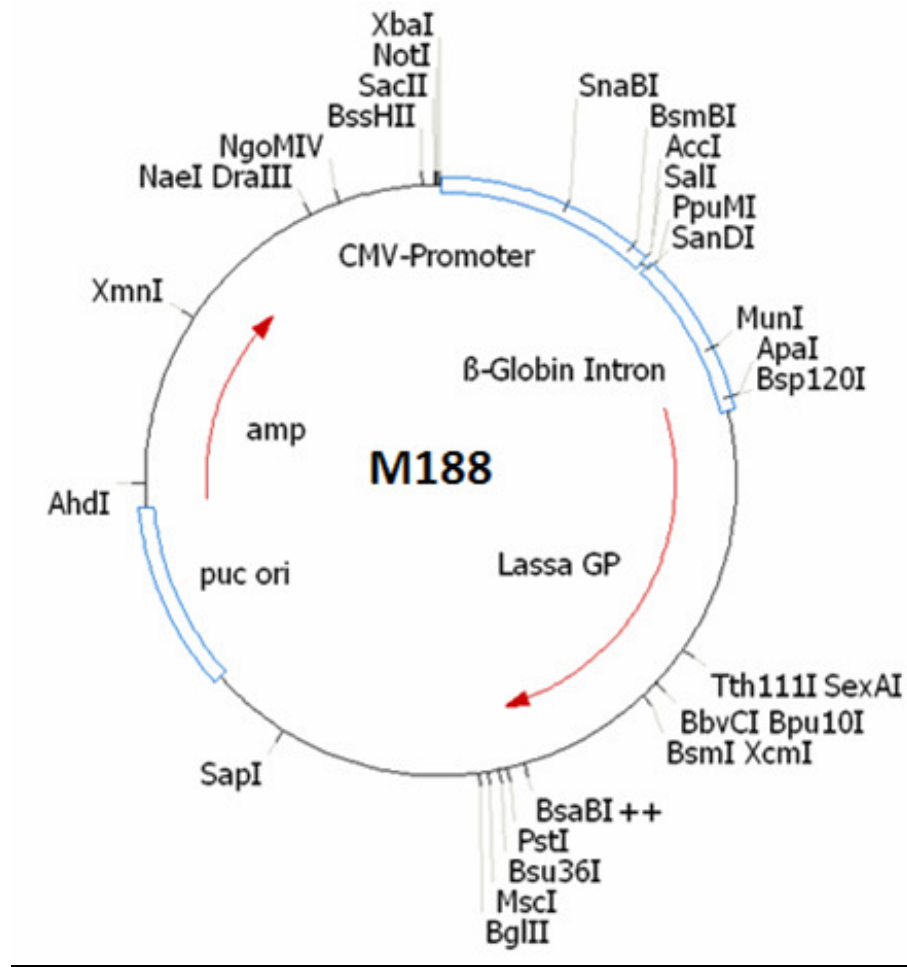
Bei allen Konstrukten sind die Restriktionsschnittstellen angegeben.

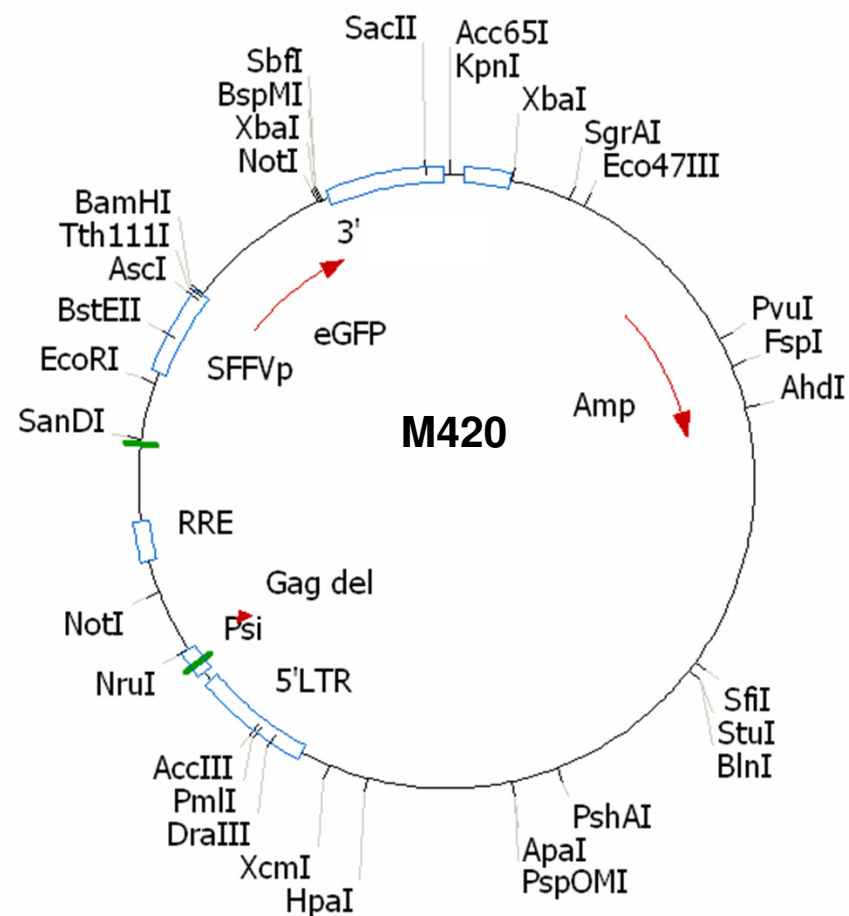
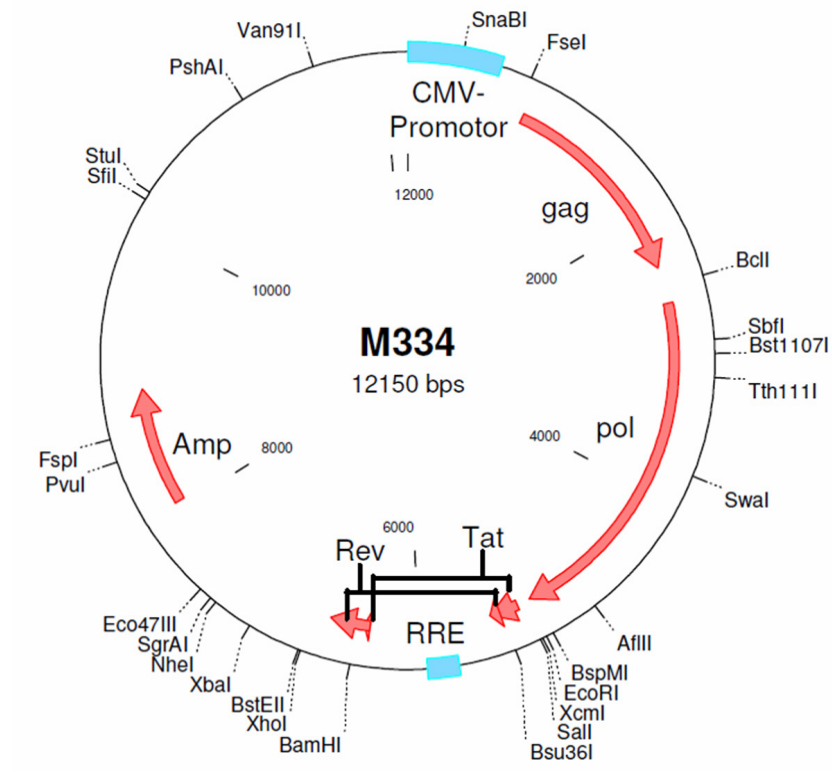


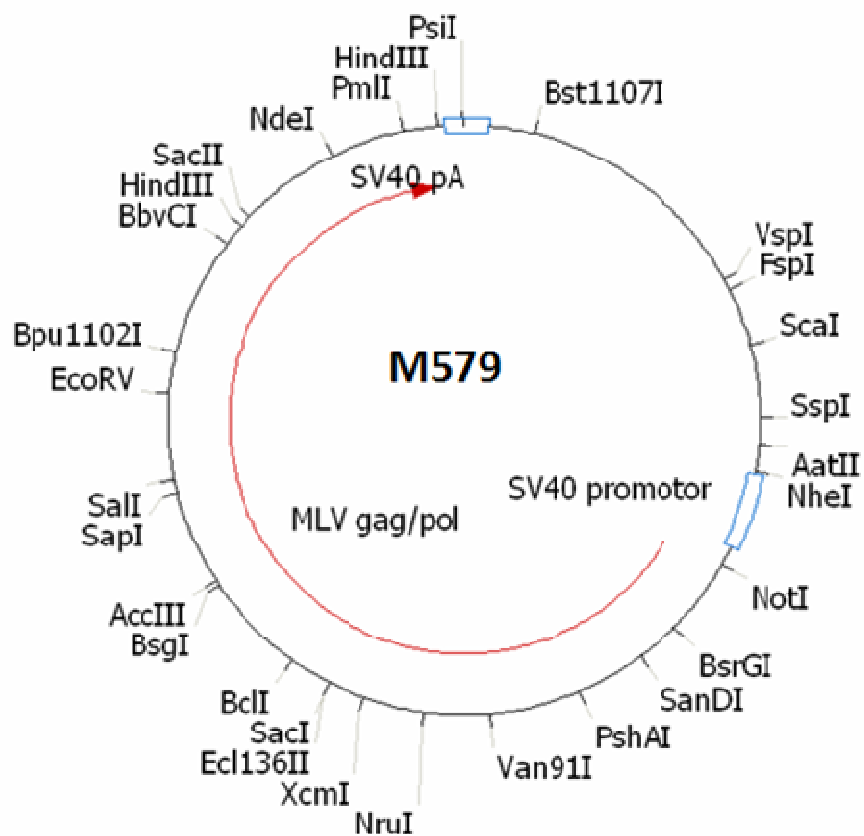
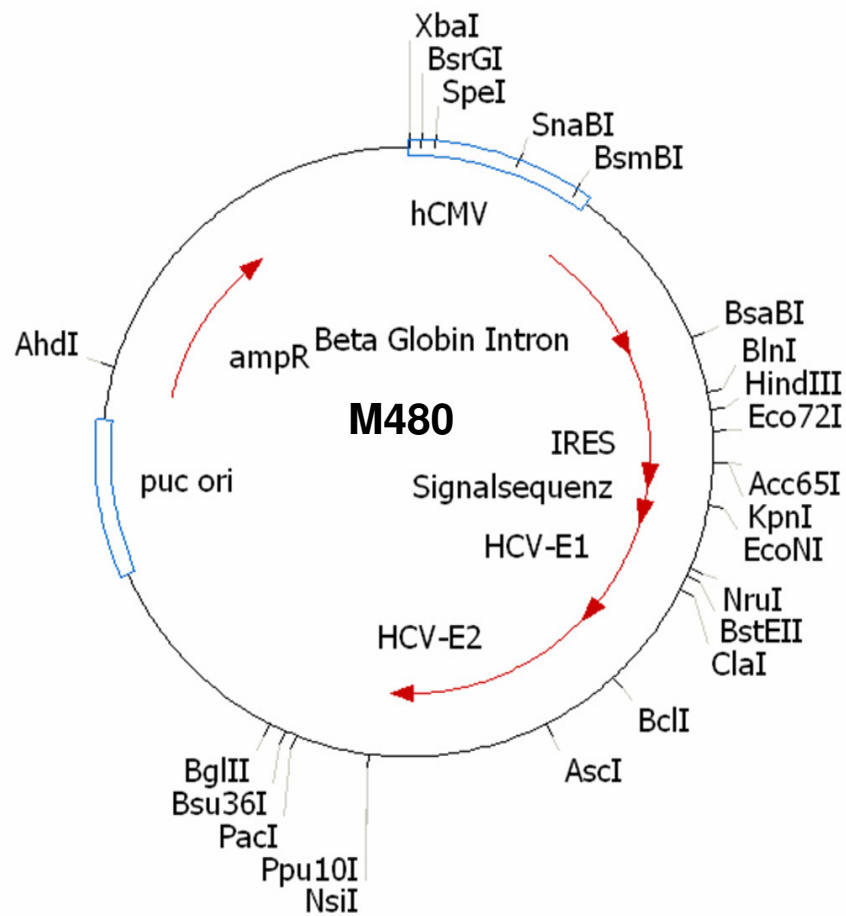


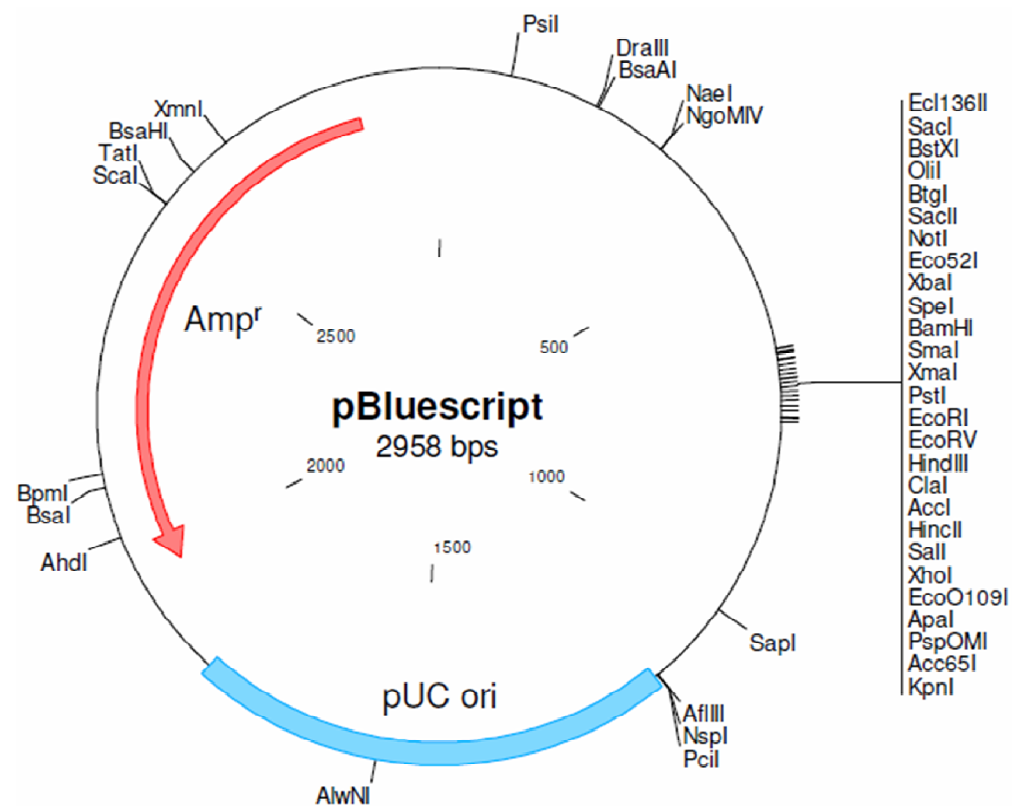
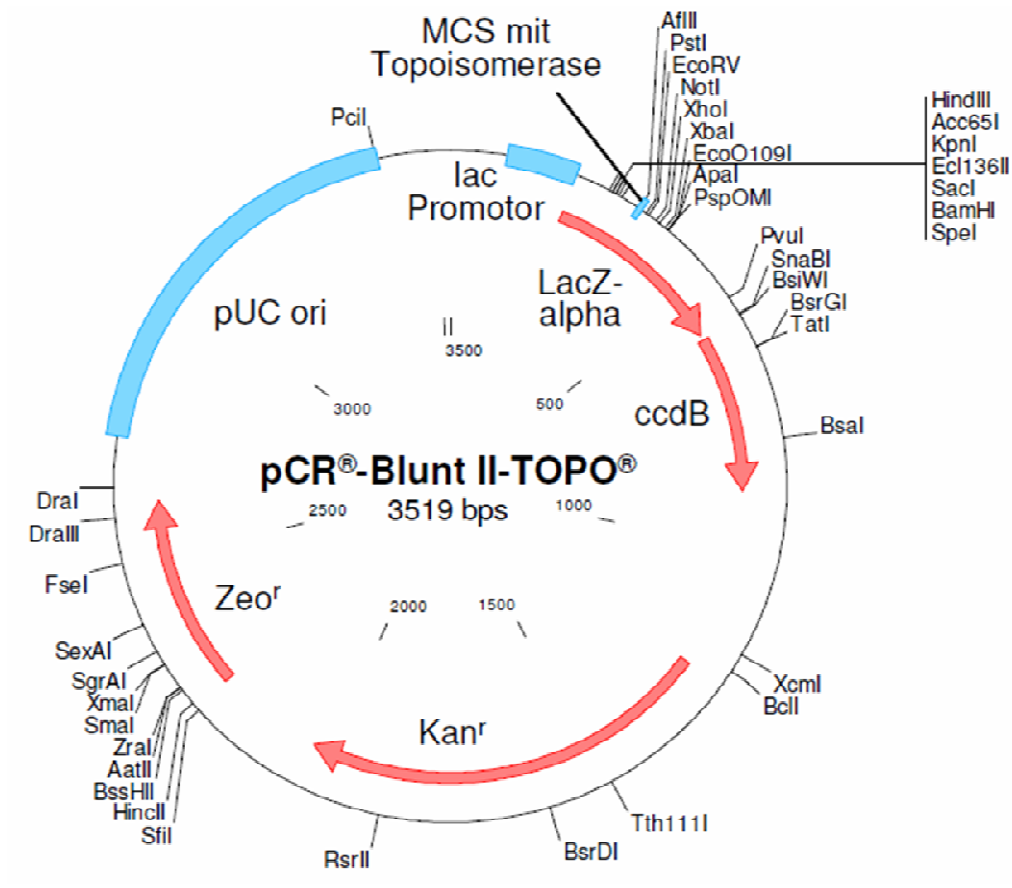


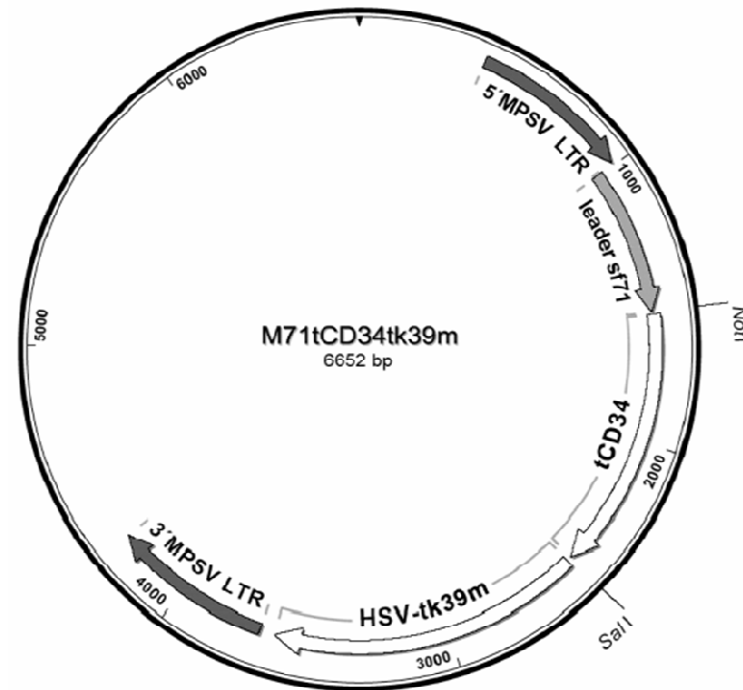
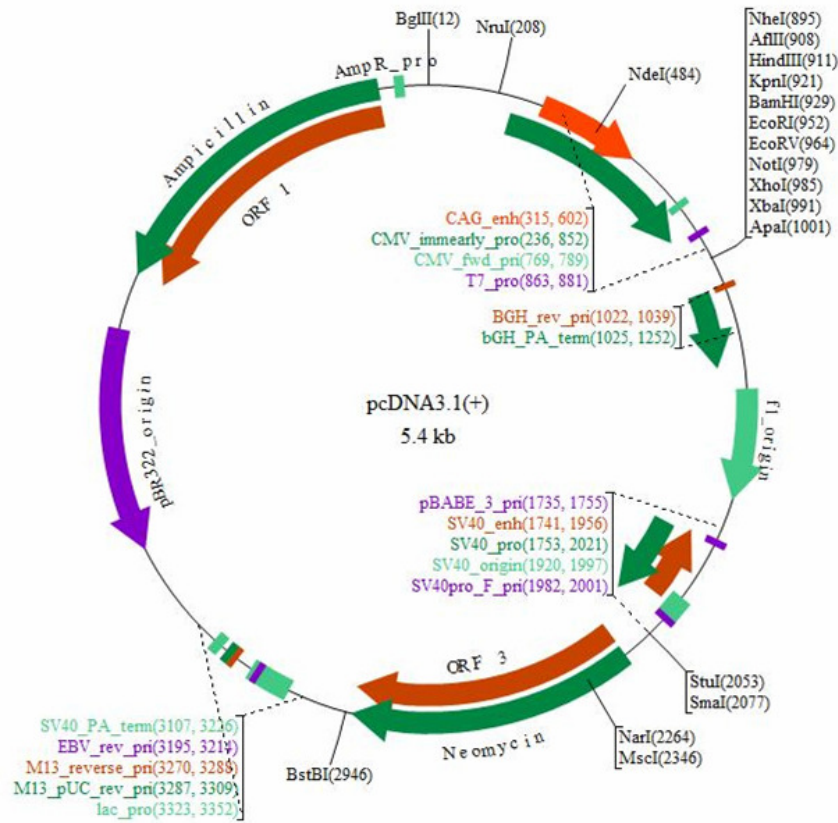












## 7.2. Abkürzungen

AK: Antikörper  
ASAT: Aspartat-Aminotransferase  
APC: Allophycocyanin  
AS: Aminosäure  
bp: Basenpaare  
BSA: Bovine serum albumin  
CDC: Center of Disease Control  
DMEM: Dolbecco's Modified Eagle Medium  
DMSO: Dimethylsulfoxid  
DNA: Desoxyribonukleinsäure  
dNTP: Desoxynukleotid-5' - Triphosphat  
*E. coli*: Escherichia coli  
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure  
ELISA: Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay)  
IFCC: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine  
IC50: mittlere inhibitorische Konzentration  
IGR: intergenische Regionen  
FCS: Fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)  
FR: Framework Region  
g: Gramm  
Gag: gruppenspezifisches Antigen  
GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase  
GPC: Glykoproteinvorläufer  
GP1: Glykoprotein 1  
GP2: Glykoprotein 2  
HIV: Humane Immundefizienz Virus  
HCV: Hepatitis C Virus  
HRP: Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase)  
hum: human  
Ig A, D, E, M, G: Immunglobulin A, D, E, M, G  
kb: Kilobasen  
kDa: Kilodalton  
LASV: Lassa Fieber Virus  
LCMV: Lymphocytären Choriomeningitis Virus  
LTR: Long Terminal Repeats  
MM: Molekulare Masse  
µg: Mikrogramm  
µL : Mikroliter  
µs: Mikrosekunde

μmol: Mikromol

min: Minute

MLV: Maus Leukämie Virus

MOI: Multiplicity of infection

NCBI: National Center for Biotechnology Information

nm: Nanometer

NIAID: National Institut of Allergy and Infectious Diseases

NP: Nukleoprotein

OD: Optische Dichte

PBMC: Periphere mononukleare Zellen (engl.: peripheral blood mononuclear cell)

PCR: Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)

PML Promyelozytisches Leukämie-Protein

PEG: Polyethylenglycol

rpm: Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)

RT: Reverse Transkriptase

RdRP: RNA-abhängige RNA-Polymerase

RNP: Ribonukleorotein-Komplex

scFv : Einzelketten variables Antikörperfragment (engl.: single chain fragment variable)

SP: Signalpeptid

SRP: Signalerkennungspartikel

VSV: Vesicular Stomatitis Virus

U: Units

UV: Ultraviolett

### 7.3. **Abbildungsverzeichnis**

	<b>Seite</b>
Abbildung 1: Die Vertreter der <i>Arenaviridae</i> .	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Lassa.	6
Abbildung 3: Genomorganisation und Replikation der <i>Arenaviridae</i> .	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Glykoproteinvorläufers präGP-C.	9
Abbildung 5: Darstellung eines reifen Trimers bestehend aus GP-1 und GP-2.	11
Abbildung 6: Replikationszyklus eines Arenavirus.	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.	20
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Fab-Fragments und scFv-Fragments.	22
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines M 13 Phagen.	23
Abbildung 10: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten pHAL 14 Vektors mit V <sub>H</sub> und V <sub>L</sub> – Genen sowie eines scFv-präsentierenden Phagen.	24
Abbildung 11: Zusammenfassung der Eigenschaften der Antikörperbibliotheken.	25
Abbildung 12: Ablauf der Selektion spezifischer Antikörperphagen (Biopanning) - schematische Darstellung.	26
Abbildung 13: Herstellung pseudotypisierter viraler Partikel über ein „drei-Plasmid-System“.	27
Abbildung 14: Projektdarstellung.	29
Abbildung 15: Herstellung einer Immunbibliothek aus dem Lymphozyten des Lassa Fieber Patienten.	62
Abbildung 16: Herstellung der Zielproteine für Biopanning und Selektion LASV-GPC-spezifischer Antikörper.	63
Abbildung 17: Titer der bindenden Antikörper in den Patientenseren.	65
Abbildung 18: Titer der neutralisierenden Antikörper in den Patientenseren.	66
Abbildung 19: Titer der kreuz-neutralisierenden Antikörper im Patientenserum III	67
Abbildung 20: Kontroll-PCR mit aus den Patienten-Lymphozyten gewonnener cDNA und GAPDH-Primern.	68
Abbildung 21: Amplifikation der Antikörperketten für die scFv-Bibliothek I.	69
Abbildung 22: Amplifikation der Antikörperketten für die scFv-Bibliothek II.	69
Abbildung 23: Schema des pHAL 14 Vektors.	70
Abbildung 24: Elektrophoretische Auftrennung des enzymatisch hydrolysierten Vektors aus dem ersten Klonierungsschritt.	71
Abbildung 25: Qualitätskontrolle der hergestellten Bibliothek mittels PCR.	72



Abbildung 26: Detektion der scFv::pIII Fusionsproteine.	73
Abbildung 27 Aufnahme von grün fluoreszierenden 293T Zellen 72 h nach Transfektion mit M56a, M579, M118 im Fluoreszenzmikroskop.	74
Abbildung 28: Phylogenie von Alt-Welt Arenaviren basierend auf der Analyse der kompletten GPC Gene.	75
Abbildung 29: Sequenzalignment der Glykoproteine der Lassa Fieber Virusstämme Josiah, AV, CSF, NL.	76
Abbildung 30: Sequenzalignment der Glykoproteine der Lassa Fieber Virusstämme Josiah und Machupo.	77
Abbildung 31: Elektrophoretische Auftrennung der enzymatisch hydrolysierten Plasmid-DNA der viralen Lassa GP.	79
Abbildung 32: Elektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNA des Z-Proteins.	79
Abbildung 33: Aufnahme von grün fluoreszierenden 293T Zellen 48 h nach retro- bzw. lentiviralen Transfektion.	80
Abbildung 34: Analyse der in HEK 293H exprimierten Glykoproteine 1 im Western Blot.	82
Abbildung 35: Immobilisieren von pseudotypisierten LASV auf Viro-Ademtech Beads.	83
Abbildung 36: Immobilisieren von pseudotypisierten Influenza Viren auf Viro-Ademtech Beads.	84
Abbildung 37: Immobilisieren von pseudotypisierten LASV auf ApoH Beads.	85
Abbildung 38: Immobilisierung der viralen Partikel auf den verschiedenen ELISA-Platten.	86
Abbildung 39: $\mu$ MACS VitalVirus HIV Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec.	87
Abbildung 40: Produktion der stabil transduzierten, CD 20/34 exprimierenden 293T Zellen zur Herstellung von pseudotypisierten LASV <sub>CD20/CD34</sub> sowie MLV <sub>CD20/CD34</sub> Partikeln.	88
Abbildung 41: ELISA Test mit pseudotypisierten LASV <sub>CD20/CD34</sub> Partikeln und anti-CD34-AK von Santa Cruz sowie Neomarkers.	89
Abbildung 42: ELISA Test mit pseudotypisierten LASV <sub>CD20/CD34</sub> und MLV <sub>CD20/CD34</sub> Partikeln und CD 20 (Retuximab).	90
Abbildung 43: Der Aufbau des Versuches zur Kopplung der viralen Partikel an magnetische Streptavidin-Beads.	91
Abbildung 44: Immobilisierung von pseudotypisierten biotinylierten LASV auf M-280 Streptavidin Beads.	91
Abbildung 45: Bestimmung der zur Immobilisierung von Viren benötigten Biotinmenge.	92
Abbildung 46: Immobilisierung viraler biotinylierter Partikel auf der ELISA Platte via Biotin/Streptavidin Bindung.	93
Abbildung 47: Versuchsaufbau zum Nachweis der viralen Infektiosität.	94
Abbildung 48: Transduktionseffizienz der biotinylierten Lassa-Partikel.	94
Abbildung 49: Immobilisierung der löslichen GP1-Konstrukte an der High Binding Platte.	95
Abbildung 50: Anzahl der Bakterienklone nach jeder positiven Selektionsrunde.	96

---

Abbildung 51: Kontrolle der Phagenverpackung im Western Blot nach zwei Selektionsrunden.	97
Abbildung 52: Aufbau des ELISA-Tests zur Analyse der Bindungskapazität der einzelnen scFv-Fragmente.	97
Abbildung 53: Analyse der Bindungskapazität der selektierten scFv-Fragmente im ELISA-Test.	98
Abbildung 54: Analyse der Bindungskapazität der selektierten scFv-Fragmente an GP1 im ELISA-Test.	99
Abbildung 55: Kontrolle der Phagenverpackung nach zwei Selektionsrunden im Western Blot.	100
Abbildung 56: Analyse der Bindungskapazität der selektierten scFv-Fragmente aus naiver Bibliothek im ELISA-Test.	101
Abbildung 57: Einzel-ELISA-Test der isolierten LASV-GPC-positiven Klone.	102
Abbildung 58: Produktkontrolle einer Kolonie-PCR im 1%igen analytischen Agarosegel.	103
Abbildung 59: Analyse der Neutralisationskapazität der selektierten scFv.	105
Abbildung 60: Analyse der neutralisierenden Eigenschaften der sechs scFv-Fragmente.	105
Abbildung 61: Zytotoxizitätstest mit scFv-haltigen Überständen <i>aus E.coli</i> auf TE 671 Zellen.	106
Abbildung 62: Western Blot Analyse der isolierten scFv-Fragmente.	107
Abbildung 63: Aminosäuren-Sequenzanalyse der vier positiven Klone aus der Immunbibliothek.	108
Abbildung 64: Aminosäuren-Sequenzvergleich der neutralisierenden Klone aus beiden Bibliotheken.	110

## 7.4. Tabellenverzeichnis

	<b>Seite</b>
Tabelle 1: Auflistung der bekannten Lassa Fieber Virusstämme.	5
Tabelle 2: Herstellung einer Phagen-Verdünnungsreihe.	45
Tabelle 3: Zusammensetzung einer enzymatischen Restriktionshydrolyse.	47
Tabelle 4: Komponentenzusammensetzung für die cDNA-Herstellung (I).	48
Tabelle 5: Komponentenzusammensetzung für die cDNA-Herstellung (II).	48
Tabelle 6a: Komponenten zur Durchführung einer PCR (RedTaq, GreenTaq).	49
Tabelle 6b: PCR-Ansatz mit DNATaq Polymerase der Firma Fermentas.	49
Tabelle 7: Temperaturverlauf einer PCR.	50
Tabelle 8: Ligationsansatz zur Herstellung eines Konstrukts sowie zur Bibliothekproduktion.	51
Tabelle 9: Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes zur Herstellung von pseudotypisierten viralen Partikeln.	54
Tabelle 10: Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes zur Produktion löslicher Proteine.	54
Tabelle 11: Titration der viralen Überstände auf entsprechenden Zelllinien.	56
Tabelle 12: Serumproben des Lassa Fieber Patienten aus dem Zeitraum Juli 2006 – Mai 2010.	64
Tabelle 13: Die Zusammensetzung der Transfektionssets und der Vergleich der viralen Titer verschiedener Pseudopartikel aus retro- und lentiviralen Verpackungssystemen nach dem Aufkonzentrieren.	75
Tabelle 14: Titer der viralen Partikel verpackt mit verschiedenen Mengen Plasmid-DNA des Z-Proteins.	80
Tabelle 15: Vergleich der CD Regionen der drei unterschiedlichen Sequenzen.	108
Tabelle 16: Genetische Analyse der aus der Immunbibliothek selektierten scFv-Sequenzen über VBASE 2 Datenbank.	109
Tabelle 17: Genetische Analyse der aus der Immunbibliothek selektierten scFv-Sequenzen über IMGT Datenbank.	109
Tabelle 18: Antigenbindungsstellen des C8/B5 Klons.	112
Tabelle 19: Genetische Analyse der aus der naiven Bibliothek selektierten scFv-Sequenzen über VBASE 2 Datenbank.	111
Tabelle 20: Genetische Analyse der aus der naiven Bibliothek selektierten scFv-Sequenzen über IMTG Datenbank.	111

## 7.5. Sequenzen der isolierten scFv-Fragmente

### Schwere Kette

```

<----- F R 1 - I M G T ----->
1 5 10 15 20 25
B9 Klon ... CDR1 - IMGT ... F R 2 - I M G T
30 35 40 45 50
B9 Klon ... ATG AAC TGT GTC CGC CAG GCT CCA GGG CAG GGG CTG GAG TGG
-----> CDR2 - IMGT <-----
55 60 65 70 75
B9 Klon GTG GCC AAC ATA AGC CCA GAT GGA AGT GGC AAA ... TCG TAT GTG GAC TCT ACG AGG ... GGC CGA TTC ACA GTG
----- F R 3 - I M G T ----->
80 85 90 95 100
B9 Klon TCT AGA GAC AAC TCC AGA GAC GCG CTA TAT CTA CAA TTG AAC AAC CTG AGA GTC GAG GAC ACG GCT ATG TAT TAT TGT
----- CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT ----->
105 109 114 120 125 130
B9 Klon GCG GGA TGG GTC GGC GAA TCA AAC TAC TGG GGA CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA
135
B9 Klon TCG GTC

```

### Leichte Kette

```

<----- F R 1 - I M G T ----->
1 5 10 15 20 25
B9 Klon CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC TCA ... GCG TCT GGG ACC CCC GGG CAG AGG GTC ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC
----- CDR1 - IMGT -----> F R 2 - I M G T
30 35 40 45 50
B9 Klon ACC TCC AGC ATC GGA AAT AAT TAT ... GTA TAC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACG GCC CCC AAA CTC
-----> CDR2 - IMGT <-----
55 60 65 70 75
B9 Klon CTC ATC TAT AGA AAT AAT ... CAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT ... GAC CGA TTC TCT GGC
----- F R 3 - I M G T ----->
80 85 90 95 100
B9 Klon TCC AAC ... TCT GGG AAC ACG GCC ACC CTG ACC ATC AGC AGG GTC GAA GCC GGA GAT GAG GCC GAC TAT TAC TGT
----- CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT ----->
105 110 115 120 125 130
B9 Klon CAG GTG TGG GAT AAT AAT GGT GAT CAT CCC CAT TAT GTC TTC GGA ACT GGG ACC AAG GTC ACC GTC CTA GGT CAG CCC
135 140 145 150 155
B9 Klon AAG GCC AAC CCC ACT GTC ACT CTG TTC CCA CCG TCC TCT GCG GCC GCA CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA GAA

```

## Schwere Kette

```

<----- F   R   1   -   I   M   G   T   ----->
1         5         10        15        20        25
D1 Klon   ... .. CDR1 - IMGT ... .. F   R   2   -   I   M   G   T
          30         35         40         45         50
D1 Klon   ... .. CDR2 - IMGT ... .. .AT GAA ATA CCT
          55         60         65         70         75
D1 Klon   ATT GCC TAC GGC AGC CGC TGG CTT GCT GCT ... .. GCT GGC AGC TCA GCC GGC CAT ... GGC CCA GGT ACA GCT
          80         85         90         95         100
D1 Klon   GCA GCA GTC AGG GGC TGA GGT

```

## Leichte Kette

```

<----- F   R   1   -   I   M   G   T   ----->
D1 Klon   CAG GCT GTG GTG ACC CAG GAG CCC TCA ... CTG ACT GTG TCC CCA GGA GGG ACA GTC ACT CTC ACC TGT GGC TCC ACC
          30         35         40         45         50
D1 Klon   ACT GGA CCT GTC ACC AAT GGT CAT TAT ... .. CCC TAC TGG TTC CAG CAG AAG CCT GGC CAA GCC CCC AGG ACA
          55         60         65         70         75
D1 Klon   CTG ATT TAT GAT ACA ACC ... .. AAG AAA TCC TCC TGG ACA CCT ... GCC CGT TTC TCC GGC
          80         85         90         95         100
D1 Klon   TCC CTC ... .. CTC GGG GGC AAA AGT GCC CTG ACC CTT ACG GGT GCG CAG CCT GAG GAT GAG GCT GAC TAT TAT TGT
          105         110         115         120         125
D1 Klon   TTA GTC TAT TAT AAT GAT GTG GGG GTG TCC GGC GGA GGG ACC AAG TTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC
          130         135         140         145         150         155
D1 Klon   TCG GTC ACA CTG TTC CCA CCC TCC TCT GCG GCC GCA CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC

```

## Schwere Kette

```

<----- F   R   1   -   I   M   G   T   ----->
1           5           10           15           20           25
G2 Klon    CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GGG GGA ... GGC TTG GTC AAG CCT GGA GGG ACC CTG AGA CTC TCC TGT GTA GCC TCA
          CDR1 - IMGT
          30           35           40           45           50
G2 Klon    GGA TTC ACC TCC AGT AAC TAC TAC ... ... ... ATG AGC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG
          CDR2 - IMGT
          55           60           65           70           75
G2 Klon    GTT TCA TAC ATT AGT AAT ACT GGT GGT ACT GTA ... ... TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG ... GGC CGA TTC ACC ATC
          F   R   3   -   I   M   G   T
          80           85           90           95           100
G2 Klon    TCC AGG GAC AAC GCC AAA AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT
          CDR3 - IMGT
          105          110          112.1          115          120          125
G2 Klon    GCG AGA GTG CGA GGT ATA CCA GCA GCT GGT ACC CTT GAC TAC TGG GGC CGG GGA ACG CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC
          130          135
G2 Klon    TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC

```

## Leichte Kette

```

<----- F   R   1   -   I   M   G   T   ----->
1           5           10           15           20           25
G2 Klon    TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT ... GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC
          CDR1 - IMGT
          30           35           40           45           50
G2 Klon    AGC CTC AGA AGC TAT TAT ... ... ... GCA AGC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT
          CDR2 - IMGT
          55           60           65           70           75
G2 klon    GTC ATC TAT GGT AAA AAC ... ... ... AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA ... GAC CGA TTC TCT GGC
          F   R   3   -   I   M   G   T
          105          110 113          115          120          125          130
G2 Klon    TCC AGC ... ... TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT
          CDR3 - IMGT
          135          140          145          150          155
G2 Klon    GCC CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCA CCC TCC TCT GCG GCC GCA CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA GAA CAA AAA
          FR4 - IMGT

```

## Schwere Kette

```

<----- F R 1 - I M G T ----->
1      5      10      15      20      25
C8 Klon GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG ... CAG CTG GTG CAG TCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT
          CDR1 - IMGT
C8 Klon GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCT ... .. ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG
-----> CDR2 - IMGT <-----
          55      60      65      70      75
C8 Klon GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA ... .. TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG ... GGC CGA TTC ACC ATC
          F R 3 - I M G T ----->
          80      85      90      95      100
C8 Klon TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT
          CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT ----->
105      110      111.1 112.1      115      120      125
C8 Klon GCG AGA GGG GGA GAC GTA CCA GCT GCC AGG AGC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
          130
C8 Klon GGG AGT GCA TCC GCC CCA

```

## Leichte Kette

```

<----- F R 1 - I M G T ----->
1      5      10      15      20      25
C8 Klon CAG GCA GGG CTG ACT CAG CCA CCC TCA ... GTG TCC GTG TCC CCA GGA CAG ACG GCC AGC ATC CCC TGC TCT GGA GAT
          CDR1 - IMGT
          30      35      40      45      50
C8 Klon GCA TTG GGG TCT AAG TAT ... .. ACT TAC TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGC CAG TCC CCT CTA CTG
-----> CDR2 - IMGT <-----
          55      60      65      70      75
C8 Klon GTC ATC TAT CAA GAT ACG ... .. AAG CGG CCC TCA GGG ATC CCT ... GAG CGA TTC TCT GGC
          F R 3 - I M G T ----->
          80      85      90      95      100
C8 Klon TCC AAC ... .. TCT GGG AAC ACA GCC ACT CTG ACC ATC AGC GGG ACC CAG GCT ATG GAT GGG GCT GAC TAT TAC TGT
          CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT ----->
105      109 114      120      125      130
C8 Klon CAG GCG TGG CAC AGT TAT AAT GCG GTT TTC GGC GGA GGG ACC AAG TTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC
135      140      145      150      155      160
C8 Klon TCG GTC ACT CTG TTC CCG CCC TCC TCT GCG GCC GCA CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC

```

---

## LEBENS LAUF

Nataliya Karpenko  
Forstring 37  
63225 Langen

**PERSÖNLICHE DATEN:** Geburtsdatum/-ort: 06.07.1979 / Stawyschtsche, Gebiet Kiew

## DISSERTATION

03/2007 – 06/2011      Wissenschaftliche Mitarbeiterin am chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer Haus (GSH, AG Dietrich) in Frankfurt am Main; Dissertationsanfertigung unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Kolmar (TU Darmstadt, Fachbereich Chemie) und Frau Dr. U. Dietrich zu dem Thema „*Selektion von Lassa Fieber Virus spezifischen single chain Fv Antikörperfragmenten aus einer Immunantikörper-Bibliothek mittels Phage-Display*“

## BIOLOGIESTUDIUM / SCHULAUSSBILDUNG

01/2006 – 09/2006      Diplomarbeit am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dencher  
Thema: *Nachweis und Charakterisierung der Atmungssuper-Komplexe in der Hefe Yarrowia lipolytica*;

10/2003 – 02/2007      Hauptstudium im Fach Biologie an der Technischen Universität Darmstadt Studienschwerpunkte: *Biochemie, Pflanzen- und Tierphysiologie*

10/2002 – 08/2003      Aufbaustudium an der Technischen Universität Darmstadt

09/1996 – 07/2001      Studium in Fächern Biologie/Chemie an der Nationalen Pädagogischen Dragomanov-Universität in Kiew, Ukraine

09/1986 – 05/1996      Gesamtschule in Stawistsche, Gebiet Kiew, Ukraine;

Nataliya Karpenko

Langen, 12 September 2011



---

Nataliya Karpenko

Langen, 12 September 2011

Forstring 37

63225 Langen

#### Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

(Nataliya Karpenko)

---

Nataliya Karpenko

Langen, 12 September 2011

Forstring 37

63225 Langen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

(Nataliya Karpenko)